

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Modularidad y heterocronía en dos eventos del desarrollo embrionario

de dos especies de erizos de mar (Familia: Echinometridae) con

desarrollo planctotrófico y diferente tamaño de huevo

Disertación previa a la obtención del título de Licenciatura en

Ciencias Biológicas

DENISSE CAROLINA GALARZA VERKOVITCH

Quito, 2014

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la señorita Denisse Carolina Galarza Verkovitch ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Oscar Damián Pérez Vaca

Director de la Disertación

26 de noviembre de 2014

*A mi madre querida,
Fuente inagotable de alegría e inspiración.
Por que la vida es más bella sonriendo junto a ti.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Dr. Oscar Pérez por recibirme con los brazos abiertos en su Laboratorio, por el apoyo incondicional y por la paciencia brindada en el desarrollo de esta investigación. Además, por los viajes para recolectar los erizos y su presencia en estos años de trabajo.

A Miriam Rivera y Álvaro Barragán por ser lectores de mi tesis y por sus comentarios que aportaron para su culminación.

Al Laboratorio de Citología de la Escuela de Ciencias Biológicas a cargo de Miriam, por dejarnos usar el microscopio de fluorescencia siempre con la mejor disposición.

Infinito amor y agradecimiento a mi mamá Irina, por darme la vida y permitirme así maravillarme con el mundo y la naturaleza, por creer en mí y siempre apoyarme. A mi hermano Alejandro por enseñarme desde chiquita a enfrentarme a la vida.

A mis queridos amigos Andrés, Gaby, Laura y Nadia por compartir conmigo sonrisas durante una de las etapas más felices de mi vida. Y a los bellos amigos que la vida me brindo, muchas gracias por crecer conmigo.

A las chicas del Laboratorio 113 de Biología del desarrollo, por su ayuda y apoyo durante la realización de mi tesis.

A Yolanda Chávez, por ayudar a que mi amor por el mar y sus bichitos crezca.

Y agradezco con mucho cariño al misterioso mar por permitirme conocerlo y trabajar con sus hermosas criaturas.

Tabla de contenidos

1. RESUMEN	12
2. ABSTRACT	13
3. INTRODUCCIÓN	14
3.2 OBJETIVO GENERAL	20
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 GRUPOS DE ESTUDIO, COLECTA DE INDIVIDUOS ADULTOS Y LOCALIDADES	21
4.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS GAMETOS	22
4.3 FECUNDACIÓN Y MONITOREO DE EMBRIONES Y LARVAS	23
4.4 PROCEDIMIENTO DE FIJACIÓN Y TINCIÓN MEDIANTE SONDAS INMUNOLÓGICAS Y NO INMUNOLÓGICAS	24
4.4.1 FIJACIÓN DE EMBRIONES Y LARVAS	24
4.4.2 TINCIÓN CON SONDAS NO-INMUNOLÓGICAS	24
4.4.4 LARVAS TRATADAS CON PHALLOIDIN	25
4.4.5 MONTAJE DE PLACAS	26
4.5 REGISTRO MICROGRÁFICO Y FOTOGRÁFICO	26
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	26
4.6.1 DILUCIÓN DE ESPERMA	26
4.6.2 TAMAÑO DE HUEVO	27

4.6.3 NÚMERO DE HUEVOS Y ESPERMA USADOS PARA LA FECUNDACIÓN	27
5. RESULTADOS	28
5.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA FECUNDACIÓN Y CULTIVO DE EMBRIONES Y LARVAS DE ERIZO DE MAR	28
5.1.1 CONTROL DE LA POLISPERMIA CON DILUCIONES DE ESPERMA.....	28
5.2 CONCENTRACIÓN DE HUEVOS Y ESPERMA PARA LA FECUNDACIÓN	29
5.3 INDUCCIONES DE LIBERACIÓN DE GAMETOS REALIZADAS EN <i>Echinometra vanbrunti</i> Y <i>Caenocentrotus gibbosus</i> EN EL AÑO 2012, 2013 Y 2014.....	29
5.4 DESARROLLO EMBRIONARIO DE <i>Echinometra vanbrunti</i> Y <i>Caenocentrotus gibbosus</i>	30
5.4.1 TAMAÑO DE HUEVO Y LEVANTAMIENTO DE LA "MEMBRANA DE FERTILIZACIÓN"	30
5.5 TABLA DESCRIPTIVA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVAL.....	30
5.5.1 NACIMIENTO.....	31
5.5.2 LARVA DE VIDA LIBRE.....	32
5.6 DESARROLLO DE LA LARVA DESDE EL NACIMIENTO HASTA LARVA PLUTEUS QUE SE ALIMENTA.....	32
5.7 MODULARIDAD, HETEROCRONÍA Y SINCRONIZACIONES TEMPORALES EN EL DESARROLLO DE <i>E. vanbrunti</i> y <i>C. gibbosus</i>	34
6. DISCUSIÓN	36
6.1 ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE FECUNDACIÓN EN <i>Echinometra vanbrunti</i>	36

6.1.1 CONCENTRACION ESPERMA EN CULTIVOS DE <i>Echinometra vanbrunti</i>	36
6.2 APLICACIÓN PROTOCOLO FECUNDACION <i>IN VITRO</i> EN <i>Caenocentrotus gibbosus</i>	38
6.3 ÉPOCA REPRODUCTIVA Y TEMPERATURA DEL AGUA	38
6.5 CARACTERÍSTICAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE <i>Echinometra vanbrunti</i> Y <i>Caenocentrotus gibbosus</i>	45
6.5.1 VELOCIDAD EN EL LEVANTAMIENTO DE LA “MEMBRANA DE FERTILIZACIÓN”	45
6.5.2 DESARROLLO DESDE LA FECUNDACIÓN HASTA LA GÁSTRULA	46
6.5.3 NACIMIENTO.....	48
6.6 VELOCIDAD EN EL DESARROLLO DESDE GÁSTRULA HASTA PLUTEUS QUE SE ALIMENTA	49
6.7 SINCRONIZACION DE EVENTOS EN EL DESARROLLO ENTRE LAS DOS ESPECIES DE ERIZO DE MAR	51
6.7.1 PRIMER CLIVAJE.....	51
6.7.2 GÁSTRULA.....	52
6.8 MODULARIDAD EN EL DESARROLLO	52
7. LITERATURA CITADA	56

Lista de Figuras

Figura 1: Endoesqueleto de <i>Caenocentrotus gibbosus</i> y <i>Echinometra vanbrunti</i>	63
Figura 2: Diagrama de caja obtenido del ANOVA de las diluciones de esperma. ...	64
Figura 3: Embriones con polispermia en <i>Echinometra vanbrunti</i>	65
Figura 4: Cultivo de embriones de <i>Echinometra vanbrunti</i>	66
Figura 5: “Membrana de fertilización” en <i>Echinometra vanbrunti</i> y <i>Caenocentrotus gibbosus</i>	67
Figura 6: Tabla de desarrollo comparativa entre <i>Echinometra vanbrunti</i> y <i>Caenocentrotus gibbosus</i>	69
Figura 7: Desarrollo temprano <i>Echinometra vanbrunti</i> y <i>Caenocentrotus gibbosus</i> revelado con DAPI	71
Figura 8: Nacimiento larva de vida libre en <i>Caenocentrotus gibbosus</i>	72
Figura 9: Desarrollo de la larva de <i>Echinometra vanbrunti</i> hasta el estadio de larva pluteus que se alimenta.	74
Figura 10: Desarrollo larval de <i>Echinometra vanbrunti</i> con el uso de sondas no inmunológicas Phalloidin y DAPI.	76
Figura 11: Desarrollo de la larva de <i>Caenocentrotus gibbosus</i> hasta el estadio de larva pluteus que se alimenta.	78
Figura 12: Desarrollo larval de <i>Caenocentrotus gibbosus</i> con el uso de sondas no inmunológicas Phalloidin y DAPI.	80

- Figura 13:** Larva de 50 horas de *caenocentrotus gibbosus* revelado con la sonda no inmunologica phalloidin.....81
- Figura 14:** El diagrama muestra las diferencias temporales del desarrollo temprano hasta larva que se alimenta y del tamaño de huevo entre las dos especies estudiadas: *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*.....83
- Figura 15:** Diagrama temporal detallado de los módulos del desarrollo embrionario y larval entre *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*..84

Lista de Tablas

Tabla 1: ANOVA de las diluciones de esperma.....	86
Tabla 2: Prueba de homogeneidad de varianzas.....	87
Tabla 3: Prueba de significancia de Tuckey.....	88
Tabla 4: Comparación del desarrollo entre <i>Echinometra vanbrunti</i> y <i>Caenocentrotus gibbosus</i>	89
Tabla 5: Fechas de inducción, número de individuos fecundados y sexo determinados.....	90
Tabla 6: Tabla descriptiva de características del desarrollo embrionario y larval en equinodermos separados por estadio.....	91

Lista de Anexos

Anexo 1: Ciclo de la mitosis celular.	93
Anexo 2: Descripción soluciones utilizadas.	94
Anexo 3: Asimetrías en el clivaje de células vegetales en erizos de mar. Organismos modelo.....	95
Anexo 4: Distribución geográfica de ambas especies de erizo de mar en el Pacífico..	96
Anexo 5: Distribución de clorofila II en los océanos del mundo.	97
Anexo 6: Tabla de desarrollo comparativo entre <i>Strongylocentrotus gibbosus</i> , <i>Echinometria vanbrunti</i> y <i>Caenocentrotus gibbosus</i>	98
Anexo 7: Corrientes marinas del Pacífico ecuatoriano..	99

1. RESUMEN

La modularidad y las heterocronías en el desarrollo embrionario son dos mecanismos que operan coordinadamente en el apareamiento de estructuras específicas en embriones y larvas. Éstos pueden disociarse desencadenando en un cambio evolutivo en la línea del tiempo. En este estudio se analizó la fecundación y el desarrollo embrionario hasta larva que se alimenta, de dos especies de erizo de mar que poseen un desarrollo plantotrófico: *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*, de la Familia Echinometridae. Se analizó la variación en los tiempos de desarrollo, tomando en cuenta el tamaño de huevo y el tiempo en el que la larva comienza a comer. Se encontraron diferencias en el desarrollo entre *E. vanbrunti* y *C. gibbosus* que se presentan como módulos, los que separan el desarrollo embrionario y larval: desde la fecundación hasta la gástrula temprana y, desde la gástrula temprana hasta la larva pluteus que se alimenta: así como, una sincronización de tiempos en el estadio de primer clivaje y gástrula. Estos resultados sugieren una heterocronía en el desarrollo embrionario con una independencia en el tiempo de desarrollo y el tamaño de huevo entre estas dos especies altamente relacionadas. Además de una heterocronía en el apareamiento de fibras musculares en la larva. Todo esto sugeriría diferencias a nivel especie-específico en características como: el levantamiento de la “membrana de fertilización”, en los tiempos de clivaje, gastrulación, formación de la larva, tiempo en el que la larva comienza a alimentarse y en consecuencia, variaciones en la estrategia reproductiva en organismos con un desarrollo plantotrófico.

Palabras Clave: Modularidad, heterocronía, desarrollo plantotrófico, estrategia reproductiva.

2. ABSTRACT

Modularity and heterochronies in embryonic development are two mechanisms that operate coordinately in the appearance of specific structures in embryos and larvae. These mechanisms can be dissociated triggering an evolutionary change in time line. In this study we analyzed embryonic fecundation and early development until the feeding larvae on two sea urchin species with planktotrophic development: *Echinometra vanbrunti* and *Caenocentrotus gibbosus*, both belonging to the Echinometridae Family. We analyzed variation in developmental times, egg size and the time which the larva starts eating. Differences in development between *C. gibbosus* *E. vanbrunti* were presented as modules, separating the embryonic and larval development in two defined modules: the first, from fertilization to the early gastrula and the second from early gastrula to a feeding pluteus larva. Also we found, synchronization in the first cleavage and gastrula. These results suggest an embryonic independent heterochrony between developmental time and egg size in these two highly related species. In addition, it has been found an interspecific heterochrony in the appearance of muscle fibers in the larva. All this suggest species-specific differences in characteristics such as: lifting fertilization membrane, the time of cleavage, gastrulation and larval formation, differences in time at which the larvae begin to feed and a variation in reproductive strategy in marine invertebrates with a planktotrophic development.

KEYWORDS: Modularity, heterochrony, planktotrophic development, reproductive strategies.

3. INTRODUCCIÓN

En los sistemas biológicos existe una organización modular, partiendo de la interacción a nivel molecular en el desarrollo, la formación de organismos y su interacción con el ecosistema (Klingenberg, 2008). Los módulos se reconocen como el conjunto de rasgos que se integran internamente en el organismo y que interactúan para la expresión de un carácter específico, pero manteniendo cierta independencia entre sí (Raff y Sly, 2000; Schlosser y Thieffry, 2000; Bolker, 2000; Klingenberg, 2008).

Las interacciones dentro de los módulos reconocen diferentes mecanismos dependiendo del contexto de estudio (Schlosser y Thieffry, 2000; Bolker, 2000). En la biología del desarrollo, este mecanismo integra diferentes niveles de organización como son las interacciones moleculares, de regulación génica y redes metabólicas, que condicionan la formación de diferentes estructuras en los embriones y larvas (Raff y Sly, 2000; Bolker, 2000). Dentro de las propiedades de los módulos en el desarrollo se debe considerar que éstos tienen una organización autónoma que está definida con la expresión de genes específicos, su organización en unidades tiende a estar sujeta a una jerarquía de eventos y una conexión entre módulos; estos módulos pueden disociarse entre sí, desencadenando evolución. Los cambios modulares pueden presentarse en tiempo y espacio, modificando sitios específicos dentro del embrión y tiempos de expresión. (Raff y Sly, 2000; Raff. y Raff, 2000).

Entonces, variaciones modulares pueden generar cambios a nivel fenotípico que se expresan por mutaciones en las regiones regulatorias de un gen a diferentes niveles (Schlosser y Thieffry, 2000; Bolker, 2000; Gilbert, 2014). Las variaciones modulares entre organismos pueden presentarse como cambios en la sincronía de procesos o heterocronía en el desarrollo (Gilbert, 2014).

Estas variaciones en el tiempo de desarrollo y su organización modular podrían explicarse primeramente, por el modo en el que los organismos se desarrollan desde que ocurre la fecundación, en donde se activa el metabolismo del oocito (Gilbert, 2014) y por la forma en la que el modo reproductivo permite que ocurra evolución (Raff y Raff R., 2000).

Después de la fecundación los huevos atraviesan por un proceso denominado clivaje, que consiste en una serie de divisiones mitóticas, en donde, el volumen del citoplasma en el huevo es dividido, dando como resultado múltiples células o blastómeros de menor tamaño. Los patrones de clivaje están controlados por la cantidad y distribución de yema que estos presenten, lo que influencia el ángulo en el que se forma el huso mitótico (Kaltschmidt y Brand, 2002; Gilbert, 2014). Dependiendo del organismo, los clivajes se presentan de diferente forma, a este nivel, se puede decir que la forma en la que el embrión se divide genera diversidad (Kaltschmidt y Brand, 2002).

La transición entre el evento de fecundación y el clivaje está controlado por elementos en la mitosis. En el desarrollo temprano, el embrión utiliza factores maternos especie-específicos para desarrollarse, y el volumen citoplasmático no incrementa. La activación del factor promotor de la mitosis (MPF, por su siglas en inglés: mitosis promoting factor) es el responsable de regular el ciclo bifásico de la mitosis en el embrión (Wolpert *et al.* 2010; Gilbert, 2014).

El ciclo celular que cumple cada blastómero del embrión incluye dos pasos: la mitosis (fase M) y la síntesis de ADN (fase S). Dentro de la mitosis existen dos fases que se presentan entre M y S. El ciclo bifásico de división celular en los blastómeros está controlado por ciclinas, que son proteínas encargadas de inducir la mitosis en su fase activa o de síntesis y permiten la síntesis de ADN en su fase inactiva o de degradación. Estos intervalos entre ciclos presentan dos interfaces: la fase G1 y G2 que se encargan del

crecimiento celular (Kaltschmidt y Brand, 2002; Gilbert, 2014). Estas interfaces se suprimen durante las primeras divisiones, como se menciona anteriormente, en estadios tempranos no hay crecimiento celular (Anexo 1).

Por otro lado, los eventos que coordinan los clivajes celulares están controlados por dos procesos cíclicos: la carioquinesis y la citoquinesis. El primero se encarga de la división mitótica del núcleo, el mismo que está controlado por los microtúbulos hechos de tubulina. Y el segundo, se encarga de la división mitótica del citoplasma, controlado por microfilamentos hechos de actina. Estos dos procesos se presentan coordinadamente generando el huso mitótico y el surco por donde ocurre el clivaje, respectivamente (Wolpert *et al.* 2010; Gilbert, 2014).

Estos eventos que controlan el ciclo de la mitosis están involucrados en la forma en la que las células se dividen, en el tamaño de los blastómeros, que está relacionada con la frecuencia en la que ocurren los clivajes. El tiempo y la forma en la que ocurren las divisiones celulares también estarían involucradas en el establecimiento de linajes celulares, en donde, se separaría al embrión en ejes corporales (Holy y Schatten, 1991).

A partir del primer clivaje los ciclos mitóticos ocurren rápidamente y de manera síncrona. Sin embargo, a medida que el material citoplasmático es usado, el embrión activa por su cuenta el nuevo material genético. Este evento se conoce como la transición media de la blástula (Gilbert, 2014). Aquí varios eventos toman lugar: se activan las fases de crecimiento celular dentro del ciclo mitótico, se pierde la sincronización de división celular y se transcribe nuevo material genético, necesario en estadios futuros del embrión (Gilbert, 2014).

Todos estos eventos son muy importantes al momento de estudiar variaciones inter-específicas entre especies de un mismo grupo. Para esto, en esta investigación se

estudiaron dos especies de erizo de mar de la familia Echinometridae: *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*, que están presentes en las costas continentales del Ecuador.

Echinometra vanbrunti (Agassiz, 1863) se encuentra desde las costas del norte de Panamá hasta el centro sur de Chile; es una especie común en las zonas intermareales.

Caenocentrotus gibbosus (Agassiz & Desor, 1846) está presente comúnmente en las costas templadas de Perú y Chile, se la encuentra también en las costas del Océano Pacífico ecuatoriano y en las Islas del Sureste de las Galápagos (Sonnenholzner *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que los erizos de mar son un buen modelo de estudio. Esto debido a su modo reproductivo, donde, en un solo evento de ovulación se liberan millones de huevos, sus huevos pueden ser fecundados y mantenidos *in vitro* con facilidad y sus embriones no son pigmentados haciendo que sus estructuras sean visibles (Hinegardner, 1975; Lyons *et al.*, 2011).

Los erizos de mar se encuentran dentro del grupo de los equinodermos que forman un clado bien definido dentro de los deuterostomados. Este grupo se caracteriza por tener un clivaje holoblástico radial y también un huevo isolecito (Flachier *et al.* 1997; Wolpert *et al.*, 2010). Los equinodermos han atraído mucha atención debido a su morfología intrigante, sus embriones experimentalmente manipulables y su importancia ecológica en el mar. (Lawrence, 1975; Flachier *et al.*, 1997; Hooker *et al.*, 2005; Domínguez *et al.*, 2007).

En el Ecuador existen 282 especies de equinodermos. De éstas especies, 51 pertenecen al orden Echinoidea, en donde se encuentran los erizos de mar (Sonnenholzner *et al.* 2011). Éstos son animales bentónicos de forma globosa. El adulto tiene simetría

radial y está cubierto por un conjunto de placas calcáreas que presentan a su vez púas móviles articuladas (Hickman, 2003).

En este estudio se pretende identificar la variación modular, 1: desde la fecundación hasta la gástrula y 2: desde la gástrula hasta la larva que se alimenta, para analizar si existe una heterocronía en la modularidad del desarrollo de embriones y larvas de dos especies de erizo de mar altamente relacionados de la Familia Echinometridae (Gray, 1855). Para esto en ambas especies, se analizó la variación en los tiempos de desarrollo, se tomó en cuenta el tamaño de huevo y el tiempo en el que la larva comienza a comer.

Para entender los cambios en el desarrollo embrionario de los erizos de mar hay que conocer cómo ocurre la reproducción de los invertebrados marinos. Para comenzar, la mayoría de ellos liberan sus gametos hacia el plancton, para que ocurra la fecundación (Strathmann, 1985; Oyarzun y Strathmann, 2011; Allen, 2012).

De la misma forma, gran parte de los invertebrados marinos poseen dos modos de desarrollo embrionario, los mismos que se encuentran relacionados al tamaño del huevo (McEdward, 1997; Zigler *et al.*, 2008).

El primero denominado lecitotrófico. Éstos son organismos que desarrollan un juvenil sin pasar por un estadio intermedio. Además, presentan huevos grandes, en un rango aproximado de 150 hasta 500 μm (McEdward, 1997). Sus larvas se desarrollan de huevos que poseen la energía suficiente para llegar a la metamorfosis, sin necesidad de una fuente exógena de energía (Allen y Pernet, 2007). Los padres de organismos con desarrollo lecitotrófico tienen una fecundidad baja, porque el número de huevos liberados por evento son pocos y su tiempo de desarrollo es más largo en la columna de agua, comparado con otras estrategias reproductivas, como la planctotrófica (Oyarzún y Strathmann, 2011).

La otra estrategia reproductiva se denomina planctotrófica, estos son organismos que generan un estadio intermedio, denominada larva de vida libre, por el que pasan antes

de generar un juvenil. Esta estrategia posee huevos de menor tamaño, entre 70 hasta 150 μm , sus huevos aportan con la energía necesaria formar una larva con la capacidad de alimentarse, pero no poseen la suficiente para llegar hasta la metamorfosis, es por esto que poseen un estadio intermedio con una larva de vida libre que se alimenta (McEdward, 1997; Zigler *et al.*, 2008; Oyarzún y Strathmann, 2011; Allen, 2012).

Así mismo, los planctotróficos poseen una fecundidad alta y presentan variación en el tiempo de desarrollo hasta llegar a la metamorfosis (Allen y Pernet, 2007; Oyarzun y Strathmann, 2011; McAlister y Moran, 2013).

El tamaño del huevo, por su relación directa con la energía, tiene influencia en características de la historia de vida que incluyen al modo de desarrollo, el tamaño, morfología, crecimiento y sobrevivencia de la larva (McAlister y Moran, 2013; Moran *et al.*, 2013)

Se considera que a nivel inter-específico existe una variación en la cantidad de energía que tiene el embrión por diferencias en el tamaño de huevo (McAlister y Moran, 2013). Se ha sugerido también que a este nivel existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño del huevo y el tiempo de desarrollo (Levitan, 2000).

Estudios comparativos de invertebrados marinos con diferente tamaño de huevo y desarrollo planctotrófico (McEdward, 1997; Levitan 2000; McEdward y Morgan, 2001; McAlister y Moran, 2013) apoyan la idea de que los huevos más grandes, que son los más ricos en energía, acortan el tiempo de desarrollo.

3.2 OBJETIVO GENERAL

- Encontrar modularidad y variación en la formación de eventos del desarrollo embrionario en dos equinoideos altamente relacionados que presentan desarrollo planctotrófico y diferente tamaño de huevo.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar el protocolo de fecundación y cultivo de embriones y larvas de erizos de mar presentes en el Ecuador.
- Tomar los datos de clivaje y desarrollo larvario para obtener una tabla de desarrollo hasta la larva pluteus de las dos especies de erizo de mar.
- Fijar embriones en los diferentes estadios embrionarios y larvarios para obtener información morfológica en los estadios de gástrula y larva planctotrófica que se alimenta.
- Teñir a los embriones fijados para observar diferencias en el tiempo de desarrollo (heterocronía) y la formación de larva funcional de vida libre.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 GRUPOS DE ESTUDIO, COLECTA DE INDIVIDUOS ADULTOS Y LOCALIDADES

Como modelo de estudio se usaron dos especies de erizo de mar de géneros distintos de la familia Echinometridae presentes en el Ecuador: *Echinometra* (Gray, 1825) y *Caenocentrotus* (Agassiz, 1846). Ambos géneros poseen una distribución amplia en el Océano Pacífico (según Kroh, 2013 (a,b) –WoRMS-).

Los individuos adultos de *E. vanbrunti* y *C. gibbosus* se colectaron de la zona intermareal de Ballenita, en la punta de Chuyuipe: S 2°12'10.0'', 80°52'59,8''W, ubicado en la Provincia de Santa-Elena, Ecuador.

Para su identificación *in-situ* se tomaron en cuenta características morfológicas como el tamaño corporal, de espinas y color de los individuos adultos. Y para una identificación más precisa en el laboratorio se realizó el protocolo de fijación y blanqueamiento para realizar el conteo del número de poros en el endoesqueleto (Figura 1).

Después de ser colectados, los individuos adultos se transportaron del intermareal hacia el sitio de trabajo. Para esto se utilizó un cooler, al que se le colocó agua de mar y hielo. Dentro del cooler se colocó a cada individuo separado individualmente en fundas zipper selladas. El hielo baja la temperatura del agua que amortiguó a cada erizo separado en su funda, reduciendo el estrés del transporte. Así mismo, si se presenta estrés, este método evita la mezcla de gametos (Sonnenholzner, com.pers., 2014).

El trabajo experimental se lo realizó en las instalaciones de Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas de la Escuela Politécnica de Litoral (CENAIM-ESPOL) ubicada en la provincia de Santa-Elena, en donde, se ambientó a los adultos en

peceras de 130 cm de largo x 70 cm de altura y 50 cm de ancho, además, en los laboratorios de CENAIM-ESPOL se realizaron los ensayos de las fecundaciones *in vitro* de ambas especies.

4.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS GAMETOS

Se siguió la técnica descrita por Clarke (2007), en donde se realizó un tratamiento químico con KCL 0.5 M, aplicando una inyección interperitoneal, diagonal y opuesta a la boca, para inducir la liberación de gametos. La dosis administrada fue de 1 ml de ésta solución en cada individuo. La liberación de gametos se dio en un periodo de 5 a 10 minutos posteriores a la aplicación de la inyección.

Al no ser posible una identificación externa de sexo en los adultos de erizo de mar, se realizó el reconocimiento de gametos para su caracterización. La apariencia de la esperma es de color blanquecino y los óvulos de color anaranjado.

Los gametos masculinos fueron recolectados con una pipeta Pasteur directamente del gonoporo en solución concentrada o “Dry sperm”. Para la fecundación es muy importante realizar diluciones adecuadas de esperma debido a que la polispermia es muy común (Hinegardner, 1969).

Los gametos femeninos o huevos fueron recolectados invirtiendo a la hembra sobre un vaso de precipitación lleno con agua de mar filtrada o AMF, cubriendo así al gonoporo. Una vez liberados los huevos se los recolectó directamente del fondo del vaso de precipitación sin hacer diluciones.

4.3 FECUNDACIÓN Y MONITOREO DE EMBRIONES Y LARVAS

La fecundación se realizó inmediatamente después de la obtención de los gametos, ya que, la viabilidad de los gametos es temporal, 15 minutos para la esperma y 30 minutos para los huevos (Strathmann, 1992).

La fecundación se realizó en una mezcla con proporción 2:1 de huevos y esperma, en un pocillo con 250 ml de AMF filtrada con un diámetro de 1 μm (Strathmann, 1992). Luego de 5 minutos se realizaron dos lavados con AMF según está descrito por Ettensolhn *et al.*, 2004, este es un paso importante para remover el exceso de espermatozoides. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura 25- 28 °C correspondiente a la temperatura del agua.

Para el éxito del experimento fue muy importante mantener limpio el medio de cultivo de los embriones y larvas. Para esto se realizaron lavados diarios usando una malla con poro de 30 μm de diámetro evitando que los embriones y larvas sean desechados. Se sustituyó el agua con AMF llegando a un volumen final del 1 % de embriones (Ettensolhn *et al.*, 2004).

Los embriones y larvas hasta el estadio de prisma fueron observados cada 30 minutos. A partir este último estadio mencionado, se monitoreo el cultivo en intervalos de 1 a 2 horas.

Por otro lado, en el estadio de larva pluteus, como sugiere Strathmann en 1992, se las alimentó con 1 ml de dilución de micro-algas (7000 cél/ml). Las micro-algas usadas fueron *Isochrysis galbana* y *Tetracelmis sp.*

Las micro-algas fueron obtenidas de los laboratorios de producción de fitoplanctón de CENAIM-ESPOL, de donde obtuvimos soluciones madre de las micro-algas. Para *Isochrysis*

galbana en una concentración de 3.2 millones de células por mililitros, y para *Tetracelmis* *sp.* de 1.8 millones de células por mililitro.

4.4 PROCEDIMIENTO DE FIJACIÓN Y TINCIÓN MEDIANTE SONDAS INMUNOLÓGICAS Y NO INMUNOLÓGICAS

Se siguió el protocolo descrito por Wanninger, 2007 tanto para la fijación de los embriones y larvas como para la tinción de los mismos.

4.4.1 FIJACIÓN DE EMBRIONES Y LARVAS

Para fijar a los embriones y larvas, se colocó el material vivo procedente del cultivo en viales de vidrio tratando de descartar la mayor cantidad de AMF. A ésta muestra se le colocó 500 µl de una solución de paraformaldehído en PBS o “PFA” al 4 % en PBS, por un periodo de dos horas. Luego, se realizaron 3 lavados en PBS 0.1 M + NaN_3 1 % . Finalmente las muestras fueron guardadas a 4°C.

4.4.2 TINCIÓN CON SONDAS NO-INMUNOLÓGICAS

4.4.2.1 PHALLOIDIN

Phalloidin es un tinte que marca actina de las células musculares, con una longitud de onda de 668 nm de emisión, revelándose de color rojo, por lo que se utilizó en las larvas de ambas especies.

Se colocó en una placa cóncava a las larvas de ambas especies, en diferentes pocillos. Con la ayuda de un estereoscopio marca Carl Zeiss modelo STEMI DV4, se observó al material fijado para que éste no sea descartado durante el proceso de tinción.

Al material fijado y conservado en PBS se lo permeabilizó con PBT (0.1 M PBS en 0.5% Triton x-100) durante una hora a temperatura ambiente (18-22 °C).

La dilución de uso de Phalloidin es de 1:40 en PBT. Por lo que, se colocó 5 µl de la solución de trabajo en un pocillo de la placa cóncava y por un intervalo de 10 minutos se dejó evaporar el metanol que éste contiene en solución. Posterior a esto, se colocaron las larvas llegando a un volumen final de 200 µl en PBT.

Se dejó 60 minutos en completa oscuridad. Luego, se realizaron 3 lavados por 10 minutos en PBT, adicional a esto, un lavado final en PBS por 30 minutos.

Se debe considerar que Phalloidin es un reactivo fotosensible, por lo que todos los pasos de la tinción se realizaron con la menor cantidad posible de exposición a la luz para maximizar la fluorescencia.

4.4.2.2 DAPI

DAPI es un tinte que marca a ácidos nucleicos. Tiene una longitud de emisión de 461 nm, que se revela en luz azul bajo un microscopio de fluorescencia.

Para los embriones que fueron conservados en PBS, primero se los permeabilizó por 60 minutos en PBT. Luego, se añadió 1 µg/ ml o una dilución 1:1000 de DAPI en PBT por un intervalo de tiempo de 5 minutos.

Después del tiempo de incubación del tinte se realizaron 2 lavados en 0.1 M de PBS por 10 minutos. Finalmente se realizó un lavado en agua destilada por 10 minutos.

4.4.4 LARVAS TRATADAS CON PHALLOIDIN

Después del procedimiento con Phalloidin, se agregó la misma solución de trabajo de DAPI que para los embriones, pero en las larvas se realizó un lavado en PBS y 2 lavados en agua destilada por 10 minutos.

Ver el anexo 2 para obtener un detalle de la composición de los diferentes reactivos usados, tanto para el protocolo de fijación como para el de tinción.

4.4.5 MONTAJE DE PLACAS

A los embriones y larvas ya teñidos se los colocó en un portaobjetos, tratando de liberar a los embriones del exceso de agua, en donde, se puso una gota de glicerol al 70 %. El siguiente paso fue colocar un cubreobjetos al que se colocaron “patitas” de plastilina en las esquinas del cubreobjetos, para evitar dañar o aplastar el material teñido. Y finalmente, la placa montada fue sellada con esmalte de uñas transparente.

4.5 REGISTRO MICROGRÁFICO Y FOTOGRÁFICO

Para registrar a los embriones y larvas se usó un microscopio invertido Carl Zeiss Jena modelo TELAVAL 3, el mismo que posee un adaptador para cámara. Se usó una cámara marca Canon modelo EOS Rebel T1I, que se encuentra en el Laboratorio de Biología del Desarrollo 113 de la PUCE. Y para revelar a los embriones y larvas tratados con sondas se usó un microscopio con capacidad fluorescente y de luz visible marca OLYMPUS modelo BX41 que se encuentra en el Laboratorio de Citología de la PUCE.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

4.6.1 DILUCIÓN DE ESPERMA

Para el éxito de la fecundación *in vitro* de los erizos de mar es importante controlar la proporción esperma – oocito, puesto que en condiciones de laboratorio la polispermia es muy común (Strathmann, 1992; Clarke, 2007). Para garantizar un éxito mayor en la fecundación *in vitro*, se pusieron a prueba tres diluciones de esperma.

Las diluciones probadas fueron: 1:1000, 5:1000 y 15:1000 de esperma en AMF. La muestra control de esperma diluida en una proporción 1:1 en AMF. La literatura sugiere que un volumen de 500 µl de AMF se añada 1 µl de oocitos y 1 µl de la dilución adecuada de esperma.

Con el programa SPSS versión 18, se realizó un análisis de variancia de una sola vía, una prueba post-hoc de significancia o Prueba de Tuckey y una prueba de homogeneidad de varianzas, o Prueba de Levene, para ver si existe diferencia entre los tratamientos.

Adicional a esto, se realizó un espermograma y un ovulograma de *Echinometra vanbrunti*, con la finalidad de ver cuál es la dilución óptima de uso de esperma en relación a la proporción de oocitos por mililitro.

4.6.2 TAMAÑO DE HUEVO

Se tomaron medidas del tamaño de huevo a partir de un $n=35$ para *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus* aplicando un análisis estadístico descriptivo en el programa SPSS.

4.6.3 NÚMERO DE HUEVOS Y ESPERMA USADOS PARA LA FECUNDACIÓN

Se realizó un conteo de espermatozoides o espermograma de la solución óptima de uso para la fecundación usando una cámara Neubauer. Se colocó una cantidad de 5 μl de la dilución 2 (5:1000), para saber la cantidad aproximada de espermatozoides en relación con el volumen de oocitos.

Para los oocitos, se realizó un conteo de la solución concentrada de oocitos en un volumen de 50 μl , repitiendo el procedimiento 5 veces.

5. RESULTADOS

5.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA FECUNDACIÓN Y CULTIVO DE EMBRIONES Y LARVAS DE ERIZO DE MAR

5.1.1 CONTROL DE LA POLISPERMIA CON DILUCIONES DE ESPERMA

El ANOVA de una vía realizado en los ensayos con *Echinometra vanbrunti*, muestra (Tabla 1) un valor de p menor a 0.05 entre inter-grupos con lo que se rechaza la hipótesis H_0 . El valor de la media de los diferentes tratamientos varia, siendo la media del tratamiento 2 (dilución 5:1000) mucho mayor que la muestra control (37.40) y los dos tratamientos restantes: 1 (dilución 1:1000) 78.40 y 2 (15:1000) 53.00, siendo de 149.20. En cuanto a la prueba de homogeneidad de varianzas (Tabla 2) se obtuvo un valor de significancia de 0.073. La prueba de Levene muestra que no existen diferencias significativas entre las varianzas de los diferentes tratamientos (Tabla 2).

En la tabla 3, se presentan los resultados de la Prueba de Tuckey, donde se ha agrupado a los tratamientos 1-3 y 3-4. Sin embargo, el tratamiento 2, se encuentra en un grupo aislado.

En el diagrama de caja (Figura 2) se muestra que el tratamiento 3 y el control están casi superpuestos. Entre tanto, el tratamiento 2 tiene una distribución mayor que los dos tratamientos y el control.

En la figura 3, se muestran embriones polispérmicos en *E. vanbrunti*. En 3A, la flecha verde señala a uno de los espermatozoides que rodean al huevo, y las flechas negras señalan una deformación en el huevo. Por otro lado en 3B, se evidencian varios conos de fertilización (flechas negras), lo que sugiere que tres espermatozoides ingresaron en el embrión. De igual forma, en la figura 4 se evidencia la diferencia visual entre un cultivo

“sano” y uno polispérmico. En 4A, se muestra un cultivo polispérmico en *E. vanbrunti*, de una dilución 15:1000, en donde se observa embriones en diferentes estadios embrionarios.

5.2 CONCENTRACIÓN DE HUEVOS Y ESPERMA PARA LA FECUNDACIÓN

El espermograma realizado en *Echinometra vanbrunti* de la dilución de uso 5:1000 muestra que en un mililitro hay 1 840 000 espermatozoides. Mientras que para el ovulograma del stock concentrado de oocitos se obtuvieron 77 000 oocitos por mililitro. En el medio donde se realizó la fecundación se encontró el valor teórico de 24 espermatozoides por huevo.

Para el cultivo madre se realizó la fecundación en 500 ml de AMF, en donde, se colocaron las diluciones correspondientes de la solución de trabajo de esperma (5:1000) y oocitos en una proporción 2:1.

En la figura 4B se puede observar como luce un cultivo “sano” de embriones de erizo de mar, resultados obtenidos con *E. vanbrunti*.

5.3 INDUCCIONES DE LIBERACIÓN DE GAMETOS REALIZADAS EN *Echinometra vanbrunti* Y *Caenocentrotus gibbosus* EN EL AÑO 2012, 2013 Y 2014

Desde el año 2012, se realizaron varias inducciones de liberación de gametos con *E. vanbrunti* y *C. gibbosus*. Las mismas que se dividen en bloques, el primero, en un periodo de nueve meses entre mayo del 2012 hasta junio del 2013 y el segundo entre los meses de marzo y abril de 2014 (Tabla 5). La liberación de gametos se ensayó en un total de 115 erizos. De los cuales, 73 fueron positivos al tratamiento químico, liberando sus gametos. Del total de inducciones para ambas especies se obtuvieron 40 hembras, 33 machos; y 42 erizos

del total no que liberaron gametos, por lo cual, no se pudo determinar su sexo. Del total de los 115 erizos ensayados 12 correspondieron a la especie de *C. gibbosus*.

5.4 DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Echinometra vanbrunti* Y *Caenocentrotus gibbosus*

5.4.1 TAMAÑO DE HUEVO Y LEVANTAMIENTO DE LA “MEMBRANA DE FERTILIZACIÓN”

Los estadísticos descriptivos del tamaño de huevo muestran que *E. vanbrunti* mide $78 \pm 2.3 \mu\text{m}$, dato que concuerda con un estudio realizado por McAlister y Moran en 2013. En cuanto a *C. gibbosus* se obtuvo una medida de huevo de $120 \pm 0.9 \mu\text{m}$.

El levantamiento de la “membrana de fertilización” ocurrió inmediatamente después del ingreso del espermatozoide en *C. gibbosus* y tardó 20 minutos en *E. vanbrunti* (Figura 14 y 15). Como se muestra en la figura 5, para el erizo negro, el espacio perivitelínico midió entre 3 a $5\mu\text{m}$ (5A y 6A), y para *C. gibbosus* midió entre 10 a $13 \mu\text{m}$ (5B y 6A') en el estadio de una célula.

5.5 TABLA DESCRIPTIVA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVAL

En la figura 6 y 7, se muestra una tabla descriptiva del desarrollo del erizo negro, *E. vanbrunti* y el erizo café *C. gibbosus*. En 6A, 6A', 7A y 7A', se muestra el estadio de una célula en donde con el tinte DAPI (7A y 7A') se muestra los núcleos condensados de un huevo fecundado o embrión. En 6B, 6B', 7B y 7B', se evidencia el primer clivaje que es meridional. El segundo clivaje en 6C, 6C', 7C y 7C', es meridional y opuesto al primero. El tercer clivaje es diferente siendo este ecuatorial. En 6D, 6D' y 7D, se indican embriones con 8 células. Y, en 7D' se muestra a un embrión de *C. gibbosus* en anafase en el estadio de ocho

células. Con las flechas rojas se marca la dirección de la división celular, en donde, el polo animal se divide meridionalmente y en el polo vegetal se divide ecuatorialmente.

Para el cuarto clivaje, en 6E y 6E' se señalan con flechas blancas a los micrómeros. Mientras que en 7E se muestra a un embrión de 16 células de *Echinometra vanbrunti* en vista vegetal; y en 7E' se muestra un embrión de *Caenocentrotus gibbosus*, en vista lateral, señalándose en ambos, los tres tipos de blastómeros característicos de este estadio, los macrómeros (mc), mesómeros (ms) y micrómeros (mm).

Para el estadio de blástula en 6F y 6F', se muestran embriones antes de nacer, cubiertos por la “membrana de fertilización”, se observa al blastocelo (señalado con flechas blancas).

Siguiente a esto, se muestra la formación de la gástrula, en donde, (Figura 6G y 6G') se señala con las flechas blancas a las células del mesénquima primario. Como se muestra en la tabla 6, ambas especies comparten las características embrionarias descritas para los equinodermos, se presenta una descripción detallada de los eventos importantes de cada estadio hasta la larva que se alimenta.

5.5.1 NACIMIENTO

Los embriones de *E. vanbrunti* y *C. gibbosus* se convierten en larva de vida libre en estadio de Blástula tardía. En la figura 8, se presenta un registro del nacimiento de blástula para *C. gibbosus*. El nacimiento ocurre desde el polo vegetal (pl v). En cuanto a las dos especies de erizo de mar estudiadas, encontramos que para *E. vanbrunti*, el nacimiento ocurre a las 5 horas y para *C. gibbosus* 3 horas y media, en ambas especies tomando el tiempo desde la fecundación (Figura 14 y 15).

5.5.2 LARVA DE VIDA LIBRE

En ambas especies este evento se sincroniza, presentándose a las 7 horas desde la fecundación. Se evidencia en este estadio de larva de vida libre una cubierta ciliar (Figura 8, 9A y 11A y 11B).

Para las 13 horas en *Echinometra vanbrunti* (Figura 9B) y 21 horas para *Caenocentrotus gibbosus* (Figura 11C); ya se encuentran en estadio de prisma donde es evidente el arquenterón (Figura 9B, 10B, 10b, 11C, 12C y 12c). En este estadio ya ocurre un posible contacto entre el arquenterón y el futuro estomodeum (Figura 12C y 12c).

5.6 DESARROLLO DE LA LARVA DESDE EL NACIMIENTO HASTA LARVA PLUTEUS QUE SE ALIMENTA

La figura 9, 10, 11, 12 y 13 muestran detalladamente el desarrollo de la larva hasta que se llega al estadio de larva pluteus que se alimenta en las dos especies de erizo de mar estudiadas.

Para *E. vanbrunti*, la figura 10A muestra el estadio de gástrula de vida libre, en donde no se muestra expresión de f-actina, señalando que en este estadio no se detecta estructuras musculares. En la figura 10B, se muestra el estadio de prisma temprana en la hora 15, donde se muestra el ingreso celular para la formación de arquenterón (Figura 10b). Para este estadio se presenta una reacción débil de phalloidin en las paredes del arquenterón que formarán células musculares en la larva derivadas del mesodermo.

Para la hora 23, en el estadio de larva pluteus temprana, ya se presenta una larva con las tres cavidades musculares ya desarrolladas, esófago, estómago y ano (Figura 9D y 10C).

En DAPI, se muestran las tres cavidades separadas por esfínteres (Figura 10c). Con Phalloidin, se marcan estructuras musculares más desarrolladas, mostrando una señal fuerte en las células del estómago. Para la hora 30, puede observar tanto con Phalloidin como con DAPI (Figura 10D y 10d) una larva pluteus que se alimenta. El marcaje de actina con Phalloidin muestra una estructura anillada en el estómago.

Mientras tanto, en la figura 9, se muestra el desarrollo larval en luz visible. Se muestran estructuras importantes de la gástrula (Figura 9A y 9B), y el ingreso de células mesénquimas. Para la hora 13, se confirma la presencia del arquenterón (Figura 9B), para la hora 23, se presenta una larva con la forma característica de cohete de la larva pluteus (Figura 9D), mientras que para la hora 30, ya se posee una larva pluteus que se alimenta (Figura 9E y 9F).

Por otro lado, para *Caenocentrotus gibbosus*, en la figura 12A, 12B y 12C se muestra que a las 7, 15 y 21 horas no existe expresión de células musculares, mientras que a las 26 horas se comienza a ver expresión de F-actina en el estadio de prisma (Figura 12D y 12d), para la hora 28 se comienza a ver la división del intestino en la larva, en donde, en la figura 12E, ya se ve el esfínter que separa al esófago del estómago. De igual forma se ve que la segmentación de las cavidades del intestino se encuentran más desarrolladas. Pero no es sino hasta la hora 50, que podemos ver una larva con un sistema digestivo avanzado, con fibras musculares organizadas en forma de anillos alrededor del estómago (Figura 13A, 13B y 13C).

En cuanto a la figura 11, que fue capturada en luz visible de *C. gibbosus*, se puede confirmar que en la hora 21 (Figura 11C) está el arquenterón. Para las 28 horas, se tiene una larva pluteus temprana con la forma característica de cohete (Figura 11D). Para las 44 horas (Figura 11E), se puede ver una larva pluteus más avanzada, con las tres cavidades del

intestino señaladas, como son la boca el intestino y el ano, en este estadio todavía la larva no se alimenta. Sin embargo, en la hora 50 se confirma que la larva se alimentó, porque en su estómago se encontró comida (Figura 11F).

Por otro lado, a las 23 horas desde la fecundación *Echinometra vanbrunti* (Figura 10C y 10c) muestra una larva pluteus con la boca formada por completo y un intestino formado. Pese a que la larva para la hora 26 (Figura 9E) ya posee todas las estructuras funcionales para alimentarse, boca, intestino contráctil y ano, esta no se alimenta sino hasta las 30 horas (Figura 9F). En el caso de *Caenocentrotus gibbosus*, para la hora 26, se muestra una larva con boca y ano (Figura 12D y 12d). Para la hora 28 (Figura 11D, 12E y 12e) presentó las características de una larva que se puede alimentar, sin embargo, no se alimentó sino hasta las 50 horas (Figura 11F y 13A, 13B y 13C).

5.7 MODULARIDAD, HETEROCRONÍA Y SINCRONIZACIONES TEMPORALES EN EL DESARROLLO DE *E. vanbrunti* y *C. gibbosus*

La tabla 4 muestra los tiempo del clivaje y desarrollo larval para ambas especies. La figura 14 y 15 muestran gráficamente, los eventos del desarrollo como son el clivaje temprano y el desarrollo de la larva relacionados con el tiempo en el que los eventos se presentaron en ambas especies de erizo de mar. El levantamiento de la “membrana de fertilización”, como se explica 5.4.1, ocurre inmediatamente después del ingreso del espermatozoide para *C. gibbosus*, mientras que para *E. vanbrunti* ocurre después de 20 minutos. La figura 14 señala la zona (marcado con rojo) del desfase en este evento. Por otro lado, el primer clivaje ocurre en la primera hora para ambas especies. A partir de este estadio, se muestra que *C. gibbosus* se divide cada 15 minutos, mientras *E. vanbrunti*, a partir del estadio de dos células se divide cada 30 minutos. Además, se observa que para las 7 horas ambas especies se sincronizan en el estadio de gástrula, donde ocurre una reorganización

celular, se evidencia en las figuras 6G, 6G', 9A y 11B, el ingreso de las células mesénquimas, su posterior reorganización (Figura 11C) y posterior invaginación celular para la formación del arquenterón (Figura 9B, 10B, 10b, 11C, 12C y 12c). A partir de aquí, los tiempos se invierten (Figura 14 y 15). *Caenocentrotus gibbosus*, forma la larva prisma temprana a las 26 horas (Figura 12D y 12d) y una larva con boca a las 28 horas (Figura 11D y 15), mientras que formará una larva con el tracto digestivo a las 44 horas (Figura 11E) y a las 50 horas, se alimenta (Figura 13). Para *Echinometra vanbrunti*, a las 23 horas llegará al estadio de prisma (figura 9D y 15), a las 17 horas formará la boca (Figura 15), para la hora 26, la larva posee ya el tracto digestivo formado, pero se alimenta a la hora 30.

En la figura 15, se detallan los mismos eventos que en la figura 14, pero dando énfasis a la presencia de dos módulos en el desarrollo embrionario y larval. El primero: desde el primer clivaje hasta la gástrula (Figura 15A), y el segundo: desde la gástrula hasta la conformación de una larva pluteus que se alimenta (Figura 15B). Aquí se relaciona gráficamente las diferencias en los tiempos de desarrollo comparado con el tamaño de huevo, que es de $\pm 78 \mu\text{m}$ para *E. vanbrunti* y de $\pm 120 \mu\text{m}$ para *C. gibbosus*.

6. DISCUSIÓN

6.1 ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE FECUNDACIÓN EN *Echinometra vanbrunti*

Para el éxito de la fecundación *in vitro*, hay que considerar varios factores: la polispermia, la concentración espermatozoos del cultivo, la dilución final del cultivo madre y la limpieza del cultivo después de la fecundación.

Los resultados obtenidos muestran diferencias claras entre los tratamientos. En condiciones donde la espermia fue más concentrada como en la dilución 15:1000, se demuestra en la figura 3A, que los embriones del cultivo no se encuentran sincronizados en los clivajes, además de embriones licuados. Mientras que en 3B, podemos ver que aplicando la dilución de trabajo que es de 5:1000, los embriones se encuentran todos en el mismo estadio, claramente se observa que los embriones son de buena calidad. En la figura 2, se observa más claramente el efecto de la polispermia sobre los embriones de 1 célula, en donde, se observa que una concentración alta de espermatozoides por huevo modifican morfológicamente a los embriones (Figura 2A), posiblemente evitando que estos se desarrollen hasta estadios avanzados.

6.1.1 CONCENTRACION ESPERMA EN CULTIVOS DE *Echinometra vanbrunti*

En cuanto a la polispermia, los estadísticos mostraron que la mejor dilución fue la dilución 5:1000. En donde, de un n=580 obtenidos de las 5 repeticiones, se confirma que el 64 % de los huevos fueron fecundados sin presencia de polispermia y un 3.5 % fueron huevos polispérmicos y un 28.5 % fueron huevos no fecundados. Este último dato no descarta hayan sido fecundados, sino que la “membrana de fertilización”

todavía no se levantaba en estos huevos; hay que tomar en cuenta que pese a que se realice el cultivo madre en un tiempo cero, algunos huevos pueden ser fecundados después que otros. Estos resultados son muy buenos si tomamos en cuenta el modo reproductivo que poseen los erizos de mar, en donde la fecundación ocurre externamente en el mar (Strathmann, 1992). Un estudio realizado con tres especies del género *Stroncylocentrotus* demostraron que existe una relación entre el tamaño de huevo y la fecundidad, en donde, las características de la espermia como longevidad y motilidad se presentan en una relación inversa al tamaño del huevo que se relacionan a factores ambientales de micro hábitat (características específicas de las corrientes y disponibilidad de alimento), competencia con especies conspecíficas y características especie específicas. Además el modo de desarrollo planctotrófico presenta una relación inversa entre la sobrevivencia y el tiempo de desarrollo, haciendo que características en individuos con desarrollo más rápido sean seleccionadas para aumentar la sobrevivencia de larvas, más tarde en el desarrollo. Todo esto sugiere que el éxito de éste modo reproductivo tiene relación no solo con características de tiempo sino también con el tipo de hábitat y factores especie específicas que moldean los caracteres en cada individuo (Levitan, 1993, 1996 y 2000). Ambas especies *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*, usadas en este estudio, presentan un desarrollo planctotrófico, con una larva de vida libre. Para un entendimiento mayor acerca de la dinámica de fecundidad se sugeriría realizar un análisis más detallado acerca de la relación fecundidad vs. tamaño de huevo y ambiente para soportar la hipótesis presentada por Levitan (1993, 1996 y 2000).

En cuanto a los demás tratamientos, se observa que para el control (dilución 1:1 espermia-oocitos) fueron fecundados el 16,04 % de los huevos contabilizados, mientras que para el tratamiento 1 (1:1000) fueron fecundados el 33,68 % y para el tratamiento

3 (15:1000) el 22,73 % de los huevos fueron fecundados sin polispermia. Estas diferencias en el éxito de fecundación muestran la importancia de realizar diluciones de esperma para la obtención de más huevos sin presencia de polispermia.

Por otro lado, la dilución final de los oocitos y la esperma en el cultivo madre le permite a los oocitos estar más espaciados en el cultivo *in vitro*, permitiendo así que los espermatozoides encuentren al oocito para fecundarlo (Clarke, 2007). La dilución ocupada del cultivo madre fue en 500 ml, en donde el stock de oocitos fue diluido hasta una concentración teórica de 154 oocitos por mililitro y 3 680 espermatozoides por mililitro, esta relación se obtuvo a partir del espermograma y ovulograma realizados en *Echinometra vanbrunti*.

6.2 APLICACIÓN PROTOCOLO FECUNDACION *IN VITRO* EN *Caenocentrotus gibbosus*

El protocolo aplicado en *Echinometra vanbrunti*, mostró resultados positivos en la fecundación *in vitro* de otra especie de erizo de mar. La figura 4, muestra un cultivo sano, en donde, los clivajes se presentan sincronos y no hay embriones licuados.

Estos resultados muestran que la estandarización de la fecundación *in vitro* para erizo de mar es exitosa, de acuerdo a las metodologías propuestas por Clarke, 2007; Ettensolhn *et al.* 2004; Hinegardner, 1969b y Strathmann, 1992; y que éste podría ser aplicada en otros equinodermos, sin duda mostrando los mismos resultados en los cultivos.

6.3 ÉPOCA REPRODUCTIVA Y TEMPERATURA DEL AGUA

Es bien conocido que en regiones con estacionalidades marcadas, los organismos marinos restringen su reproducción a las épocas más cálidas del año (Sonnenholzner *et al.*, 2012). Sin embargo en el trópico, la temperatura fluctúa levemente a lo largo del año

(Sonnenholzner *et al.*, 2012), por lo que podríamos esperar un patrón diferente con respecto a la época del año en la que los erizos de mar se reproducen.

En el Ecuador, la temperatura del agua varía levemente a lo largo del año. Según registros tomados por el INOCAR (Instituto de Oceanografía de la Armada) el rango de temperatura anual en el agua está entre los 22°C y 26°C, dependiendo de la época del año. Acorde con Sonnenholzner *et al.*, 2012, los meses de mayor actividad reproductiva en equinoideos son los meses de diciembre y junio, donde la temperatura del agua varía entre 25°C y 27°C. Existen dos picos de temperatura, el primero de mayo a junio y el segundo de diciembre a febrero, donde la temperatura del agua varía de los 25°C a 27°C. Para esta investigación, los meses en los cuales se obtuvieron conjuntamente los dos gametos, y así mismo fertilizaciones, fueron mayo, junio y agosto del 2012 y el mes de marzo y abril del 2014 (Tabla 5). Estos resultados, para el 2012, corresponderían a uno de los picos de mayor actividad reproductiva en el mes de junio, donde la temperatura del agua es alta (de 24°C a 25°C). Para el año 2014, los meses donde se obtuvieron las fecundaciones están corridos un poco del pico reproductivo, sugiriendo que estos individuos se reproducen no necesariamente dentro de los picos reproductivos. Estos resultados no contradicen lo demostrado por Sonnenholzner *et al.*, 2012, ya que las reproducciones pueden ocurrir en varias ocasiones durante el año.

Adicionalmente, existieron meses en los cuales no se obtuvieron los dos gametos conjuntamente. En dos de nueve meses ensayados solamente se obtuvieron gametos masculinos (septiembre 2012 y junio de 2013); mientras que, en cuatro de los nueve meses ensayados (julio, noviembre del 2012 y febrero, mayo de 2013) solamente se obtuvieron gametos femeninos. Estos resultados demuestran una actividad parcial reproductiva fuera de los picos de mayor reproducción, lo que probaría que los erizos de mar, al menos de la

especie *Echinometra vanbrunti*, podrían tener una actividad reproductiva varias veces en el año, debido a que en todos los ensayos al menos un individuo libero gametos. Y de esta forma se podría concluir que los individuos que no liberaron gametos, pudieron haberlos liberado en un evento anterior a la captura del erizo de mar para este estudio.

Como ha sido presentado, la temperatura del agua juega un rol importante en la reproducción. Pero, la temperatura también influye en el desarrollo embrionario de organismos marinos. Sewell (1999) demostró en experimentos realizados con *E. lucunter* que la temperatura en el agua influye en el desarrollo dependiendo del estadio. Sin embargo, los embriones y larvas de *E. vanbrunti* y de *C. gibbosus* fueron mantenidos a una temperatura constante de 25°C. Las diferencias encontradas en esta investigación acerca de la variación en distintos estadios del desarrollo de ambas especies se deben a características especie-específicas independientes de la temperatura (Andronikov, 1975).

6.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS HUEVOS DE *Echinometra vanbrunti* Y *Caenocentrotus gibbosus*

Las diferencias en el tamaño de huevo encontradas entre las dos especies de erizo de mar se podrían explicar: 1) la inversión energética, por parte de la madre varíe en la producción de cada oocito, modificando el tamaño del huevo (McAlister y Moran, 2013). 2) Por características ambientales, como disponibilidad de alimento (Moran y Allen, 2007) y por la historia natural del organismo (Moran y Allen, 2007; McAlister y Moran, 2013).

Primeramente, se discute que un tamaño de huevo más grande, por poseer mayor cantidad de yema o energía, provee a la larva de la suficiente energía endógena para subsistir más tiempo sin dependencia de fuentes externas de alimento (Moran y Allen, 2007).

Se encontró que la larva de *Caenocentrotus gibbosus* comienza a alimentarse a las 50 horas, 20 horas más tarde que *Echinometra vanbrunti*, que comienza a alimentarse a las 30 horas. Esto podría explicarse, debido a que, un huevo más grande, por poseer mayor cantidad de yema o energía, es capaz de proveer a la larva de la energía endógena suficiente para subsistir más tiempo sin dependencia de fuentes externas de alimento. Esto a su vez, le permitiría alargar su tiempo como larva de vida libre, sin intervenir en su sobrevivencia (Moran y Allen, 2007).

Por otro lado, estudios sugieren que la variación que se presenta en el tamaño del huevo está relacionada no solo a factores intrínsecos de cada huevo (Levitan, 1996; Ettensolhn *et al.*, 2004), sino que también están relacionadas a la historia natural de cada especie (Levitan, 1996). En el caso de *Strongylocentrotus purpuratus*, modelo tradicional en la biología del desarrollo, posee un huevo de 80 μm (Ettensolhn *et al.*, 2004), tamaño muy parecido al de *Echinometra vanbrunti* ($\pm 78 \mu\text{m}$). Sin embargo, como se muestra en el anexo 6, presenta un desarrollo más lento. La independencia en el tiempo de desarrollo vs. tamaño de huevo se podría explicar por factores ambientales en los que se encuentra *S. purpuratus*, éste es un erizo con una distribución amplia en zonas templadas, a lo largo de las costas del noreste Pacífico llegando a Alaska (Calvin *et al.* 1985), en condiciones naturales se reproduce a una temperatura que oscila entre los 4 a los 12°C (Ettensolhn *et al.* 2004), lo que demuestra que las interacciones que gatillan un modo de desarrollo, incluyen a las interacciones bióticas a la que es sometida cada especie, no solamente a su carga genética.

También, características de la larva, como es el tracto digestivo, mostró diferencias entre las dos especies de erizo de mar. En el estudio realizado por Moran y Allen en 2007, se explica que un huevo grande, además de proveer una independencia energética mayor, permite la generación de una larva con un tracto digestivo de mayores dimensiones, esto

probablemente, tiene relación con la independencia energética mayor durante el desarrollo de la larva, en donde, la energía se concentra en el crecimiento de estructuras larvianas, más no en la obtención de alimento para garantizar la sobrevivencia. Como se muestra en la figura 12, en la larva de *C. gibbosus*, de 50 horas (figura 12), el tracto digestivo estomacal es de mayor dimensión, midiendo 37.72 μm , de un total larvario de 145 μm , ocupando el 26 % de la superficie de la larva pluteus (figura 12B). En *C. gibbosus*, las fibras musculares forman un anillo alargado que representa el 26 % de la larva pluteus de dos brazos. Para *E. vanbrunti*, se observa de igual forma, en la larva de 30 horas (figura 9D y 9d) a las fibras musculares formando un anillo. Sin embargo, en una larva que mide 126 μm en el estadio de larva pluteus de dos brazos, las estructuras musculares en el estómago de la larva miden 22.39 μm , representando el 17.76 % de la larva. Estas diferencias en las dimensiones de estructuras musculares, soportan los resultados obtenidos en el estudio de Moran. y Allen en 2007.

Si tomamos en cuenta al tipo de estrategia reproductiva para explicar las diferencias encontradas en el desarrollo embrionario y larval, llegamos a otra característica especial del grupo de los equinodermos. En este grupo es característica la relación directa del tamaño del huevo con el tipo de larva que forma (Edward, 1997; Emlet y Hoegh-Guldberg, 1997). Los equinodermos que tienen un huevo de 70 a 150 μm de diámetro generan una larva planctotrófica en la mayoría de los casos (McEdward, 1997). Para ambas especies el tamaño del huevo se encontró dentro de este rango ($\pm 78 \mu\text{m}$ para *Echinometra vanbrunti* y $\pm 120 \mu\text{m}$ para *Caenocentrotus gibbosus*), pero estos siendo diferentes en el tamaño de huevo, como ambos están en el rango de tamaño de huevo con larva planctotrófica, se confirma para las dos especies de erizo de mar estudiados que cumple con la teoría propuesta por la bibliografía. (McEdward, 1997; Emlet y Hoegh-Guldberg, 1997).

En segundo lugar, la estrategia reproductiva podría variar debido a características ambientales como la temperatura de agua, corrientes marinas y la disponibilidad de alimento, como se discute también en la sección 6.4, éstas podrían moldear la distribución geográfica de cada especie.

Si relacionamos la temperatura del agua, la época reproductiva y la disponibilidad de alimento, encontramos primeramente que existe una relación directa entre la distribución de ambas especies con respecto a la disponibilidad de alimento. En el anexo 4 se muestra la distribución de ambas especies en el Pacífico, la distribución de ambas especies es diferente, pero se solapan en las costas del Pacífico ecuatoriano y peruano. Ahora, si observamos el anexo 5, vemos una imagen satelital proporcionada por Oceancolor, grupo de estudios oceanográficos MODIS (por sus siglas en inglés: Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer) de la NASA, aquí se mide concentración de clorofila tipo II, presente en los organismos fitoplanctónicos de los que se alimentan muchos organismos marinos. Encontramos que las zonas teñidas con verde, amarillo, naranja y rojo, que son las de una concentración 0.6 y 0.9 mg/m^3 , de una escala que de 0.01-1 mg/m^3 , de clorofila a lo largo del año en el Pacífico (Anexo 5); coinciden con las localidades en donde se han registrado las dos especies de erizo de mar (información adquirida de WoRMS, por sus siglas en inglés: world register of marine species). Resulta que, sin importar si es una zona tropical o temperada, tanto *Echinometra vanbrunti* como *Caenocentrotus gibbosus*, se encuentran presentes en donde la cantidad de alimento se encuentra disponible a lo largo del año. Esta información se ve soportada con la bibliografía (Lessios, 1990; D' Croz y Robertson, 1997); ya que, la disponibilidad de alimento que tienen las larvas presentes en el Pacífico es constante anualmente, por la naturaleza de sus corrientes (McAlister y Moran, 2013), la fría de Humboldt y la cálida de Panamá (Anexo 7).

Y en tercer lugar, la evolución del tamaño de huevo en los invertebrados marinos con larva planctotrófica, como sugiere Levitan en 1996 y 2000, se debería no solo a factores post-zigóticos como los discutidos anteriormente, sino a una variación pre-zigóticas que involucra a las variables que se presenten antes de que ocurra la fecundación del huevo en el medio marino. Levitan afirma que la esperma es un limitante que ejerce presión selectiva en el tamaño de huevo, en donde, la selección de un huevo más grande está relacionada indirectamente con la poca disponibilidad de esperma. Es decir, que en condiciones naturales, si la disponibilidad de esperma decrece el tamaño de huevo óptimo aumenta. La literatura concuerda con los resultados observados *in situ* durante la experimentación de fecundaciones *in vitro*. Para *Echinometra vanbrunti* los adultos machos liberaron entre 0.5 a 1 ml de solución de esperma seca, mientras que los machos de *Caenocentrotus gibbosus* liberaban entre 0.2 a 0.5 ml de esperma seca. Por otro lado, el espermograma realizado para las dos especies muestra que la concentración por unidad de volumen de la esperma (μl) es muy parecida entre ambas especies de erizo de mar. Para la dilución de trabajo (5:1000), el espermograma presentó para *E. vanbrunti*, 1 840 000 espermatozoides por mililitro; mientras que para *C. gibbosus* presentó 2 113 000 espermatozoides por mililitro. Las diferencias encontradas de la cantidad de espermatozoides pueden deberse a errores de conteo bajo la cámara de Neubauer. De todas formas, la concentración de espermatozoides no presenta una variación marcada entre las dos especies. La diferencia en el tamaño de huevo entre *C. gibbosus* y *E. vanbrunti* podría ser explicado aplicando la teoría propuesta por Levitan, en donde la disponibilidad de esperma tendría una relación indirecta con el tamaño de huevo.

Estas diferencias en la velocidad del desarrollo de las dos especies sugieren que no son dependientes de la cantidad de yema y están controladas por factores especie-específicos.

6.5 CARACTERÍSTICAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Echinometra vanbrunti* Y *Caenocentrotus gibbosus*

6.5.1 VELOCIDAD EN EL LEVANTAMIENTO DE LA “MEMBRANA DE FERTILIZACIÓN”

Un evento importante que realiza el oocito fecundado para garantizar su desarrollo es el levantamiento de la “membrana de fertilización”. Esta membrana antes de que el oocito sea fecundado se encuentra adherida con enlaces proteicos a la membrana hialina (Gilbert, 2014). Una vez que ocurre la fecundación la “membrana de fertilización” se levanta separando ambas membranas por la acción de una bomba iónica de Ca^{++} ; además, este cambio de iones activa el metabolismo del huevo. Este evento se conoce como el bloqueo lento, este evento fue desarrollado por los equinodermos para evitar la polispemia de los oocitos (Gilbert, 2014) porque crea una barrera física para el ingreso del espermatozoide.

Gilbert en 2014, describe que el bloqueo lento en los equinodermos se presenta a partir del minuto del ingreso del esperma. Sin embargo, las dos especies de erizo de mar estudiadas presentaron una variación muy marcada en el tiempo que se levanta esta membrana.

E. vanbrunti levantó su membrana a los 20 minutos de la fecundación mostrando un espacio perivitelínico de 3 μm y *C. gibbosus* levanto su membrana inmediatamente después del ingreso del esperma, presentando un espacio perivitelínico de 12 μm ; este evento fue observado *in situ* bajo el lente de un microscopio, en donde se colocó una muestra de oocitos y una gota de la solución de trabajo del esperma; monitoreando en que momento ocurría el levantamiento de la “membrana de fertilización”. Estos resultados

sugieren que la activación de los factores maternos ocurre antes para *Caenocentrotus gibbosus*.

Si relacionamos la cantidad de huevos liberados por especie con el tiempo del levantamiento de la membrana podemos sugerir que una estrategia diferente de desarrollo, la presenta *C. gibbosus*, el mismo que libera más huevos por evento reproductivo y responde más rápido al levantamiento de la “membrana de fertilización” (Figura 5A, 5B, 6A y 6A’) evitando velozmente que haya polispermia en sus embriones.

6.5.2 DESARROLLO DESDE LA FECUNDACIÓN HASTA LA GÁSTRULA

Ambas especies de erizo de mar analizadas mostraron tener un clivaje típico descrito para los equinodermos, holoblástico radial, con una distribución de yema isolecita. Esta información se confirmó en la figura 7, donde se evidencia en 7B’, los núcleos en estadio de anafase de la mitosis, sugiriendo la dirección en la que está ocurriendo la formación de nuevos blastómeros en el embrión de dos células de *Caenocentrotus gibbosus*, siendo esta nueva división opuesta y meridional al primer clivaje. Por otro lado, en 7D’, en el estadio de ocho células de la misma especie, se evidencia la transición del clivaje a las 16 células, en donde, se muestra un embrión en vista vegetal, evidenciándose una división desigual de las células, característicos de este clivaje. Este clivaje es importante porque es aquí en donde se establece el organizador del embrión. Se evidencia en 7D’, la inversión de los ángulos de los ejes, la organización de los núcleos sugiere que los husos mitóticos se han organizado invertidamente en 90°. Como esta descrito en la literatura (Holy y Schatten, 1991; Wolpert *et al.*, 2010; Gilbert, 2014) el cuarto clivaje presenta divisiones asimétricas. El polo animal, dividiéndose meridionalmente para formar 8 blastómeros del mismo tamaño o mesómeros (ms) y el polo vegetal ecuatorialmente, formando células de diferentes tamaños, cuatro células formarán blastómeros grande o

macrómeros (mc) y cuatro blastómeros o micrómeros (mm) (Figura 7E, 7E', 7F y 7F'), estos últimos formarán el organizador del embrión, que en estadios posteriores dividirán al embrión en territorios específicos en la larva. El clivaje ecuatorial, como esta descrito en Kaltschmidt y Brand, 2002, las células vegetales de un embrión de erizo de mar en clivaje migran lateralmente ubicando al centrosoma por fuera del centro del blastómero en división. Esto organiza a los microtúbulos y al surco mitótico asimétricamente (Anexo 3) formando células de diferente tamaño. Debido a que no se pudieron revelar las muestras de embriones teñidas con α -tubulina por problemas en el protocolo de revelado, se sugiere realizar nuevamente la tinción de los embriones para confirmar la organización diferencial de los husos mitóticos.

En cuanto al desarrollo temprano de las dos especies estudiadas encontramos diferencias en el tiempo en el que cada clivaje tuvo lugar hasta el estadio de gástrula. Como se muestra en la figura 14 y 15, *Caenocentrotus gibbosus* presenta clivajes cada 15 minutos a partir del primer clivaje hasta el estadio de 64 células, este dato fue confirmado visualmente mediante un conteo de células; y *Echinometra vanbrunti* presenta clivajes cada 30 minutos, en ambos las divisiones fueron sincronas, siendo también verificadas *in situ* al menos 4 veces, en las dos especies.

Como se menciona anteriormente, ambas especies pertenecen al clado de los euequinoideos. Otra característica de este grupo, además de la membrana hialina conspicua, es la presencia de micrómeros de forma, tamaño y número regular en el cuarto clivaje (Strathmann, 1992; Ettensolhn *et al.*, 2004; Gilbert, 2014). Esta característica fue encontrada y registrada claramente para las dos especies de erizo de mar estudiadas (Figura 5 y 5'E y 6E y 6E').

En la figura 6, tanto *Echinometra vanbrunti* como *Caenocentrotus gibbosus* presentan el típico desarrollo holoblástico radial. Además, ambas especies comparten las

características morfológicas desde la fecundación hasta el estadio gástrula, como se detalla en la tabla 4. Sin embargo, como muestra en la figura 14 y 15, se presentaron diferencias en los tiempos en que los clivajes tuvieron lugar. Estas diferencias y desfases en la sincronización de los clivajes, se podrían explicar por varios factores, que han sido discutidos anteriormente, como: el tamaño de huevo, factores ambientales, como la temperatura, y factores moleculares especie-específicos.

Además si tomamos en cuenta la dinámica a nivel celular, donde, los ciclos de división celular están controlados por la velocidad a la que ocurre la mitosis en los blastómeros; una explicación para la variación en la velocidad del desarrollo viene a ser el cumplimiento del ciclo bifásico en la mitosis (Kaltschmidt y Brand, 2002). La velocidad a la que ocurre la síntesis y degradación de la enzima ciclina estaría relacionada con el tiempo en el que se forma un blastómero (Gilbert, 2014). Siendo de esta forma, los clivajes en *C. gibbosus* tendrían un ciclo de síntesis y degradación de ciclinas más corto entre división celular comparado con *E. vanbrunti*. La interacción molecular del ciclo celular podría explicar el porqué de las diferencias en los tiempos de clivaje en el desarrollo embrionario de estas dos especies de erizo de mar estudiadas.

6.5.3 NACIMIENTO

El nacimiento del embrión en el estadio de blástula es un evento muy importante en el desarrollo de los equinodermos (Lepage *et al.*, 1992). En el estadio de blástula, las células poseen territorios específicos que son controlados por mensajes maternos que generarán posteriormente estructuras específicas en la larva. Para el final de este estadio la blástula nace, este evento se ha visto que es altamente controlado por el embrión, mediante la secreción de proteasas que desintegran la membrana de protección (Lepage *et al.*, 1992; Davidson, 2006).

En ambas especies (*Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*) el nacimiento ocurre con el desprendimiento de la “membrana de fertilización”, mediante el uso de los cilios (Lepage y Gache, 1990; Lepage *et al.*, 1992).

Si comparamos ambas especies de erizo de mar estudiadas, encontramos que existen diferencias en el tiempo en el que la larva nace. Como se detalla en la figura 14 y 15, el nacimiento ocurre primero en *C. gibbosus*, a las 3 horas y media, y en *E. vanbrunti*, a las 5 horas. Estas diferencias temporales, podrían deberse a factores especie-específico, en donde, *C. gibbosus*, tendría diferenciados los territorios celulares antes que *E. vanbrunti*.

6.6 VELOCIDAD EN EL DESARROLLO DESDE GÁSTRULA HASTA PLUTEUS QUE SE ALIMENTA

A partir de la gastrulación, ambas especies invierten sus tiempos de desarrollo. Como se explica previamente, el desarrollo temprano por clivaje ocurre más rápido en *C. gibbosus*, presentándose clivajes cada 15 minutos, llegando a blástula a las 3 horas y media y alcanzando la gástrula a las 7 horas. Mientras que para *E. vanbrunti* presenta clivajes cada media hora, llegando a blástula a las 5 horas y alcanzando la gástrula a las 7 horas. A partir de aquí, ambas especies invierten sus tiempos. Como se muestra en las figuras 8 y 9, *E. vanbrunti*, a partir del estadio de gástrula, comienza a formar estructuras larvales, como son: el endoesqueleto (estructuras derivadas de células de mesénquima primario), evidentes a las 15 horas. Estas estructuras esqueléticas modifican la forma de la larva, volviéndola más alargada (Figura 8B, 8C, 9B y 9b), hasta que alcanza la forma característica de cohete en la larva pluteus (Figura 8E y 8F); y el sistema digestivo. Este último muestra para las 23 horas, una larva con todas sus estructuras características, como son: la boca, estómago, intestino y ano (Figura 9C y 9c). Al contrario, *C. gibbosus* muestra diferencias temporales, demorándose 21 horas en presentar estructuras esqueléticas (Figura

11C, 11c, 11D y 11d) y 28 horas en marcar territorios músculo-digestivo como se muestra en la figura 11E y 11e.

Por otro lado, en cuando al desarrollo de estructuras musculares en la larva, como se muestra en los resultados, existe un período de latencia en la que la larva pluteus está lista para alimentarse, sin embargo, tiene un periodo sin hacerlo (Figura 14 y 15). Registros *in situ*, muestran que la larva de *Echinometra vanbrunti* presenta contracciones y movimientos de sus esfínteres y esófago a las 26 horas, este sería un indicativo de estructuras funcionales en la que la larva, en donde ella no se alimenta. No es si no 4 horas después que la larva comienza a alimentarse de las células de fitoplancton agregadas al cultivo, mostrándolas almacenadas en su estómago. Por otro lado, *Caenocentrotus gibbosus* alcanza una larva pluteus funcional que no se alimenta las 44 horas (registros *in situ*), pero no es sino hasta las 50 horas, pasando 8 horas sin comer. Estos resultados, como se indica en la sección 6.4 de la discusión, podrían deberse a la influencia que tiene el tamaño de huevo, no solo en los tiempos de desarrollo temprano y larval, sino también en la capacidad de sobrevivir sin alimento. En condiciones naturales, en la columna de zooplancton, el tiempo que un organismo pase sin alimentarse se relaciona negativamente con su sobrevivencia (McAlister y Moran, 2013).

Por un lado, esto sugeriría que las larvas de *C. gibbosus*, tendrían una sobrevivencia relativa menor que *E. vanbrunti*, por pasar mayor tiempo sin alimentarse.

Sin embargo, el estudio realizado por Moran y Allen en 2007, como se discute en la sección 6.4, sugiere que la estrategia reproductiva en huevos más grandes, permite que la larva pase más tiempo en la columna de agua sin alimentarse, porque la larva sigue recibiendo alimento de fuentes endógenas provistas por la madre del oocito. En este caso no se concluye si es beneficioso o no pasar más tiempo sin alimentarse en la columna de

agua, debido a que esto es un resultado complejo que involucra interacciones con el ambiente y factores zigóticos específicos de cada especie.

6.7 SINCRONIZACION DE EVENTOS EN EL DESARROLLO ENTRE LAS DOS ESPECIES DE ERIZO DE MAR

Como ha sido presentado en este estudio, se encontraron desfases temporales tanto en el clivaje como en la formación de la larva que se alimenta.

Sin embargo, existieron dos eventos importantes, en donde, los tiempos de desarrollo se sincronizaron en ambas especies: 1) el primer clivaje, que ocurrió en la primera hora a partir de la fecundación, 2) la gastrulación, que se presentó a las 7 horas (tabla 4, figura 14 y 15).

6.7.1 PRIMER CLIVAJE

Echinometra vanbrunti y *Caenocentrotus gibbosus* son grupos hermanos de la familia Echinometridae. La sincronización del primer clivaje podría explicarse debido a su cercanía en la filogenia.

En desarrollo, la dinámica embrionaria está controlada por genes presentes en el ADN, como factores de transcripción de origen maternal que regulan la expresión génica en el embrión por elementos *cis-regulatorios* (Davidson, 2001).

Como ambas especies son altamente relacionadas entre sí, no es de extrañarse que la dinámica génica entre *E. vanbrunti* y *C. gibbosus* sea parecida; al menos en el establecimiento metabólico del embrión recién fecundado hasta que se alcanza el primer clivaje. Esta sincronización podría explicarse por el parentesco de ambas especies en la filogenia y dada la complejidad de la dinámica molecular en el desarrollo es probable que ambas especies se demoren el mismo tiempo hasta completar el primer clivaje, en donde,

como es mostrado en la tabla 6 y en la sección 5.4, la primera división es meridional y completa, aquí, cada blastómero tiene polo animal y vegetal.

6.7.2 GÁSTRULA

El estadio de gastrulación es muy importante, debido a que, en este punto la larva experimenta una reorganización celular para la formación de las tres capas germinales (Davidson, 2001; Gilbert, 2014). Además en la gástrula, los factores de transcripción de muchos genes se activan, marcando territorios específicos para la formación de estructuras larvales (Raff y Sly, 2000; Klingenberg, 2008; Gilbert, 2014).

La sincronización de este evento podría explicarse, de igual forma, a la compleja red génica de expresión proteica. Los resultados también sugerirían una independencia de la cantidad de energía provista por la madre en el oocito inicial y de condiciones ambientales como la temperatura del agua y época del año.

6.8 MODULARIDAD EN EL DESARROLLO

Una variación en los eventos en el desarrollo podrían gatillar diferencias entre individuos de diferentes especies a varios niveles. Si tomamos en cuenta que organismos adultos son el conjunto de sistemas organizados en jerarquías estructurales y subunidades funcionales, entonces, los eventos presentados en la ontogenia serían procesos localizados y dinámicos (Raff, 1996; Gilbert, 2014).

Las diferencias en el desarrollo entre *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus* se presentan en módulos en dos eventos importantes en el desarrollo embrionario y larval tienen que ver con el modo reproductivo, con factores ambientales como el establecimiento de un micro hábitat, que está influenciado por las corrientes de agua y su temperatura, a factores de distribución y abundancia y, a características especie-específicas, como sugirió Levitan en sus estudios realizados con diferentes grupos de

equinoideos (Levitan, 1993, 1996 y 2000).

Los módulos que se encontraron están divididos se presentan en dos eventos en el desarrollo. El primero, que se establece desde el primer clivaje hasta la gastrulación. Este evento como se explica en la sección 6.7.1, se pudo haber establecido por su cercanía en la filogenia, lo que sugiere que son grupos cercanamente relacionados que no se han separado lo suficiente como para cambiar temporalmente en la expresión de sus estructuras. Para confirmar esta hipótesis, se sugiere realizar análisis moleculares que estudien la molecularmente la cercanía en la filogenia entre estas dos especies.

Y, el segundo, que se establece desde la gástrula, éste evento es muy importante porque es aquí en donde ocurre una reorganización celular en todo el embrión y donde, los factores de transcripción de muchos genes se activan marcando territorios de expresión específicos dentro del embrión, los mismos que luego formarán a la larva pluteus (Raff y Sly, 2000; Klingenberg, 2008; Gilbert, 2014). La formación de la larva es un evento importante en los organismos con desarrollo planctotrófico, porque este es un estadio intermedio en donde la larva depende de una fuente exógena de alimento para desarrollar un juvenil (McAlister y Moran, 2013).

Como se menciona anteriormente en esta sección, la división modular presentada en este estudio, además, sugeriría que los tiempos de desarrollo temprano no son dependientes de la cantidad de yema y están controladas por factores especie-específicos, podrían tener una explicación si se toma en cuenta factores bióticos ambientales, de distribución y abundancia.

De igual forma, éstos módulos muestran que existe una variación en la estrategia reproductiva que tiene que ver con la inversión energética por parte de la madre en el oocito (tamaño de huevo), con la disponibilidad de alimento (columna fitoplancton) y la

historia natural de ambas especies, que pese a ser cercanas evolutivamente presentan variaciones en los tiempos de desarrollo. Este es el primer acercamiento detallado de las variaciones en la estrategia reproductiva en el desarrollo temprano. Los estudios realizados acerca de las interacciones ecológicas y evolutivas en el desarrollo de organismos con desarrollo planctotrófico se han concentrado en el entendimiento global del desarrollo larval hasta el metamorfo (Wray y Raff, 1991; McEdward, 1997; Levitan 2000; McEdward y Moran 2001; Allen y Pernet, 2001; Zigler *et al.* 2008; Oyarzun y Strathmann 2011; McAlister y Moran 2012), haciendo de este estudio pionero en el análisis de estrategia reproductiva en el desarrollo temprano.

6.9 HETEROCRONÍAS EN EL DESARROLLO

La variación en la sincronía en la que se presentaron los clivajes tempranos y la formación de la larva que se alimenta, de las dos especies, se encuentran distribuidas asimétricamente dentro de los dos módulos identificados.

En la figura 15, se muestra claramente el desfase temporal en la que los clivajes ocurren, mostrando también que las heterocronías están distribuidas dentro de los dos módulos identificados en esta investigación. Como se explica en 6.5.2, la desincronización de los clivajes se podría explicar por la dinámica de control celular que tiene que ver con el ciclo mitótico. Sin embargo, esto no explicaría en su totalidad el porqué del desfase de las divisiones celulares. Davidson, 2001 demostró que el establecimiento de territorios en la embriogénesis y estructuras en la organogénesis, se encuentran controladas por una compleja red de factores *cis* y *trans* regulatorios. Estos factores juegan un papel muy importante en la especiación y evolución de caracteres que podría explicar cómo los organismos cambian y de esta forma justificar la diversidad de organismos.

Entonces, para entender de una forma más detallada la dinámica de estas desincronizaciones y módulos en el desarrollo; se sugiere la continuación de esta

investigación con análisis moleculares, donde se identifique la expresión de genes claves en el desarrollo muscular de la larva y genes involucrados en el control de los ciclos celulares en el desarrollo temprano.

7. LITERATURA CITADA

Allen, J. 2012. Effects of egg size reductions on development time and juvenile size in three species of echinoid echinoderms: Implications for life history theory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **422**: 72-80.

Allen, J. y Pernet, B. 2007. Intermediate modes of larval development: bridging the gap between planktotrophy and lecithotrophy *Evolution & Development* **9**: 643-653.

Bolker, J. 2000. Modularity in Development and Why It Matters to Evo-Devo. *American Zoologist*. **40**: 770-776.

Clarke, H. 2007. Sea Urchins Embryos. En: Center for Cell Dynamics. Universidad de Washington-Friday Harbor.[en línea]:

<http://raven.zoology.washington.edu/celldynamics/downloads/methods/protocols.html>

[Consultado: junio 2012].

Davidson, E. 2001. *Genomic Regulatory Systems. Development and Evolution*. Elsevier. Pag:1–23. Capítulo 1: Regulatory Hardwiring: A brief overview of the genomic control apparatus and its causal role in development and evolution.

D’Croz, L. y Robertson, D. 1997. Coastal oceanographic conditions affecting coral reefs on both sides of the Isthmus of Panama. *Coral Reef Symposium* **2**: 2053–2058.

Domínguez, A., López M. y Benítez, F. 2008. Changes in population densities of *Diadema mexicanum* at Bahía de Huánuco, Western Mexico. *Revista Biology of the Tropics*. **56**: 255–263.

Dyachuk, V. y Odintsova, N. 2013. Larval myogenesis in Echinodermata: conserved features and morphological diversity between class-specific larval forms of Echinoidea,

Asteroidea, and Holothuroidea.

Ettensohn, C., Wray, G. y Wessel, G. 2004. Procurement, maintenance and culture of oocytes, embryos, larvae and adults. Vol. 74 Development of sea urchins, Ascidians, and Other Invertebrate Deuterostomes: Experimental Approaches. El Servier Academy Press **1**: 18–70.

Flachier, A. 1997. Diagnóstico ecológico y socioeconómico del área Marino-Costera del Parque Nacional Machalilla. Proyecto INEFANGEF. [en línea]: http://web.ambiente.gob.ec/sites/default/files/users/jloartefls/Diagnostico_ecologico_y_socio-economico_area_marina-costera_PN-Machalilla.pdf [Consultado: octubre 2013].

Gilbert, S. 2014. Fertilization: Beginning a new organism. Sea Urchins and Tunicates y Sea Urchins and Tunicates: Deuterostome Invertebrates. En: Gilbert S. 2014. Developmental Biology. **10**: pg. 118-151; 218 - 232. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts USA.

Hickman, T. 1993. Echinodermata. En: Laboratory studies in Integrated Principles of Zoology. McHill. **6**: 45–67.

Hinegardner, R. 1975. Morphology and Genetics of Sea-Urchin Development. American Zoologist. Developmental Biology of the Echinoderms. **15**: 679–689.

Holy, J. y Schatten, G. 1991. Differential behavior of centrosomes in unequally dividing blastomeres during fourth cleavage of sea urchin embryos. Journal of Cell Science. **98**: 423-431.

Hooker, Y., Solís-Marín, F. y Llellish, M. 2005. Equinodermos de las Islas Lobos de Afuera (Lambayeque, Perú). Revista Peruana de Biologic. **12**: 77–82.

Kaltschmidt, J. y Brand, A. 2002. Asymmetric cell division: microtubule dynamics and spindle asymmetry. *Journal of Cell Science* **115**: 2257-2264.

Klingenberg, C. 2008. Morphological Integration and Developmental Modularity. *Annual Reviews of Ecological and Evolutionary Systems*. **39**: 115-132.

Kroh, A. (a). 2013. *Echinometra vanbrunti* A. Agassiz, 1863. En: Kroh, A. & Mooi, R. (2013) World Echinoidea Database.. [en línea]: <http://www.marinespecies.org/Echinoidea/aphia.php?p=taxdetails&id=513244> en 2013-09-04 [Consultado: octubre 2013].

Kroh, A. (b). 2013. *Caenocentrotus gibbosus* (L. Agassiz, in L. Agassiz & Desor, 1846). En: Kroh, A. & Mooi, R. (2013) World Echinoidea Database. [en línea]: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=513158> [Consultado: octubre 2013].

Lawrence, J. 1975. On the relationships between marine plants and sea urchins. *Oceanography and Marine Biology*. **13**: 213–28.

Lepage, T. y Gache, C. 1990. Early expression of a collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *EMBO Journal* **9**: 3003–3012.

Lepage, T., Sardet, C. y Gache, C. 1992. Spatial Expression of the Hatching Enzyme Gene in the Sea Urchin Embryo. *Developmental Biology* **150**: 23–32.

Lessios, H. 1990. Adaptation and phylogeny as determinants of egg size in echinoderms from the two sides of the Isthmus of Panama. *American Naturalist* **135**: 1–13.

Levitan, D. 1993. The importance of sperm limitation to the evolution of egg size in marine invertebrates. *The American Naturalist*. **141**: 517-536.

Levitan, D. 1996. Predicting optimal and unique egg sizes in free-spawning marine invertebrates. *American Naturalist* **148**:174–188.

Levitan, D. 2000. Optimal Egg Size in Marine Invertebrates: Theory and Phylogenetic Analysis of the Critical Relationship between Egg Size and Development Time in Echinoids. *The American Naturalist* **156**: 175–192.

Lyons, D., Kaltenbach, S. y McClay, D. 2011. Morphogenesis in sea urchin embryos: linking cellular events to gene regulatory network states. *Developmental Biology*. **2**: 231–252.

Maccherone, B. 2014. MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer)web from NASA. [en línea]: <http://modis.gsfc.nasa.gov/about/> [Consultado: septiembre 2014].

McAlister, J. y Moran, A. 2012. Relationships among Egg Size, Composition, and Energy: A Comparative Study of Geminate Sea Urchins. *PLoS ONE* **7**: e41599

McEdward, L. 1997. Reproductive Strategies of Marine Benthic Invertebrates Revisited: Facultative Feeding by Planktotrophic Larvae. *The American Naturalist* **150**: 48-72.

McEdward, L. y Morgan, K. 2001. Interspecific Relationships between Egg Size and the Level of Parental Investment per Offspring in Echinoderms *Biological Bulletin* **200**: 33-50.

Moran, A., McAlister, J. y Whitehill, A. 2013. Eggs as Energy: Revisiting the Scaling of Egg Size and Energetic Content Among Echinoderms. *Biological Bulletin*. **224**: 184–191.

Moran, A. y Allen, J. 2007. How Does Metabolic Rate Scale With Egg Size? An Experimental Test with Sea Urchin Embryos. *Biological Bulletin*. **212**: 143–150.

Malley, R. 2014. Ocean productivity. Información tomada de MODIS (por sus siglas en inglés: Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer) de la NASA, página de la Universidad de Oregon. [en línea]: <http://www.science.oregonstate.edu/ocean.productivity/> [Consultado: septiembre 2014].

Oyarzun, F. y Strathmann, R. 2011. Plasticity of Hatching and the Duration of Planktonic Development. *Marine Invertebrates. Integrative and Comparative Biology*. **51**: 81–90.

Pennington, T. 1985. The ecology of fertilization of echinoid eggs: the consequences of sperm dilution, adult aggregation, and synchronous spawning . *Biological Bulletin* **169**: 417–430.

Raff, A. y Sly, B. 2000. Modularity and dissociation in the evolution of gene expression territories in development. *Evolution and Development*. **2**: 102–113.

Raff, A. y Raff, E. 2000. Dissociability, modularity, evolvability. *Evolution and Development*. **5**: 235-237.

Schlosser, G. y Thieffry, D. 2000. Modularity in development and evolution□. Review of the symposium held at the Hanse Institute for Advanced Study Delmenhorst, Germany, *BioEssays*. **11**: 1043-1045.

Sonnenholzner, J., Brandt, M., Francisco, V., Hearn, A., Luzuriaga, M., Guarderas, P. y Navarro, J. 2011. Echinoderm Research in Ecuador, Chapter 6, **1**: 183–232 En: Alvarado J, Solís-Marín, F. (eds.). En: *Echinoderm Research and Diversity in Latin America*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

Strathmann, M. 1992. Reproductive and development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast. *Data and Methods for the Study of Eggs, Embryos and Larvae*.

Strathmann, R. 1985. Feeding and nonfeeding larval development and life-history evolution in marine invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 339–361.

Wanninger, A. 2007. Manual de Procedimientos de manejo de embriones de la Universidad de Viena, Facultad de Vida y Ciencia, Departamento Integrative Zoology

Wolpert, L., Tickle, C., Laurence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J. y Jessell, T. 2010. Development of nematodes, sea urchins, and ascidians. En: *Principles of Development*. Oxford. **4**: 232–243.

Wray, G. y Raff, R. 1991. The evolution of developmental strategy in marine invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution*. **6**: 45-50.

Zigler, K., Lessios, H. y Raff, R. 2008. Egg Energetics, Fertilization Kinetics, and Population Structure in Echinoids With Facultatively Feeding Larvae. *Biology Bulletin* **15**: 191–199.

8. FIGURAS

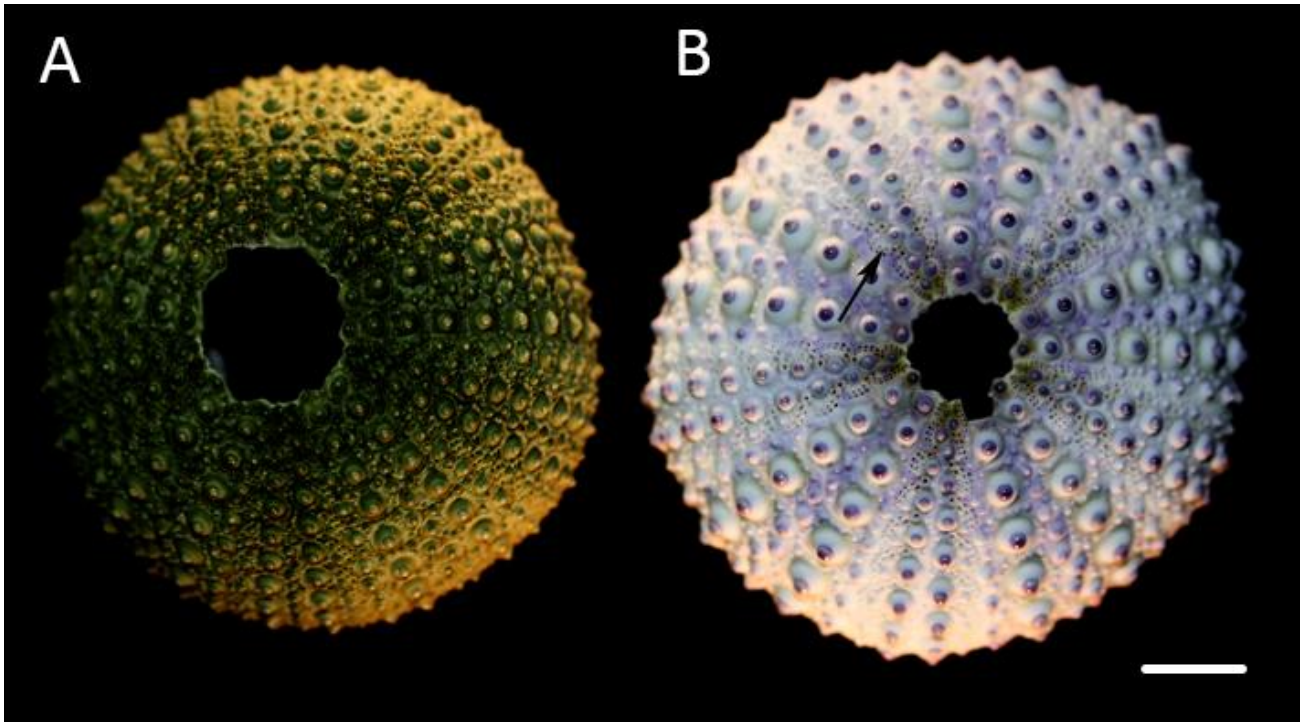


Figura 1: Endoesqueleto de *Caenocentrotus gibbosus* y *Echinometra vanbrunti*. Endoesqueletos usados para la identificación taxonómica en laboratorio de las dos especies de erizo de mar. A) *C. gibbosus*. B) *E. vanbrunti*. La flecha señala los poros en el ambitus. La línea de referencia para las dos figuras es de 1 cm.

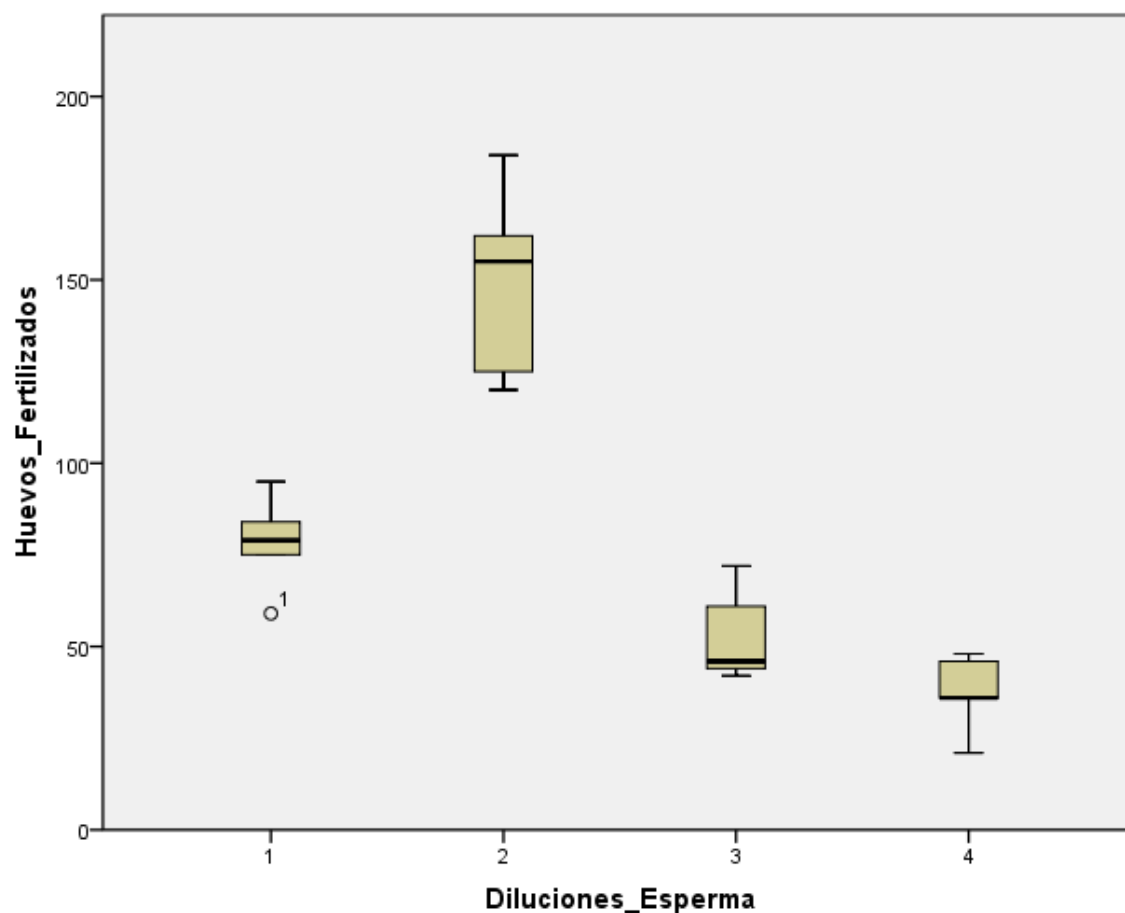


Figura 2: Diagrama de caja obtenido del ANOVA de las diluciones de esperma. El diagrama de caja muestra las diferencias entre los tratamientos en cuanto a la cantidad de huevos fecundados sin polispermia obtenidos en cada tratamiento. Se observa que el tratamiento 2 es muy diferente a los demás, presentando un mayor número de huevos fecundados. En cuanto al tratamiento 3 y 4, se observan valores muy parecidos de fecundación. Para el tratamiento 3 se muestra que la media se encuentra dentro del rango de distribución del tratamiento 4.

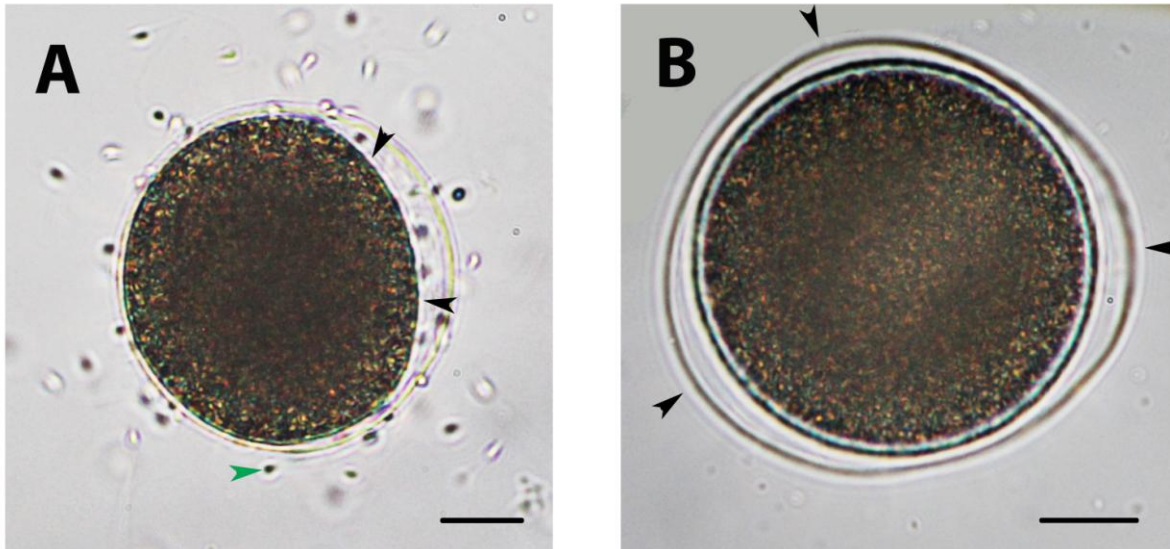


Figura 3: Embriones con polispermia en *Echinometra vanbrunti*. En la figura 2A se muestra un huevo rodeado de espermatozoides (flecha verde). Con las flechas negras en 2A se muestra una deformación en la forma del huevo. En 2B se señalan varios ‘conos de fertilización’ en el mismo huevo, confirmándose la presencia de polispermia. Barra de referencia para ambas figuras es de 20 µm.

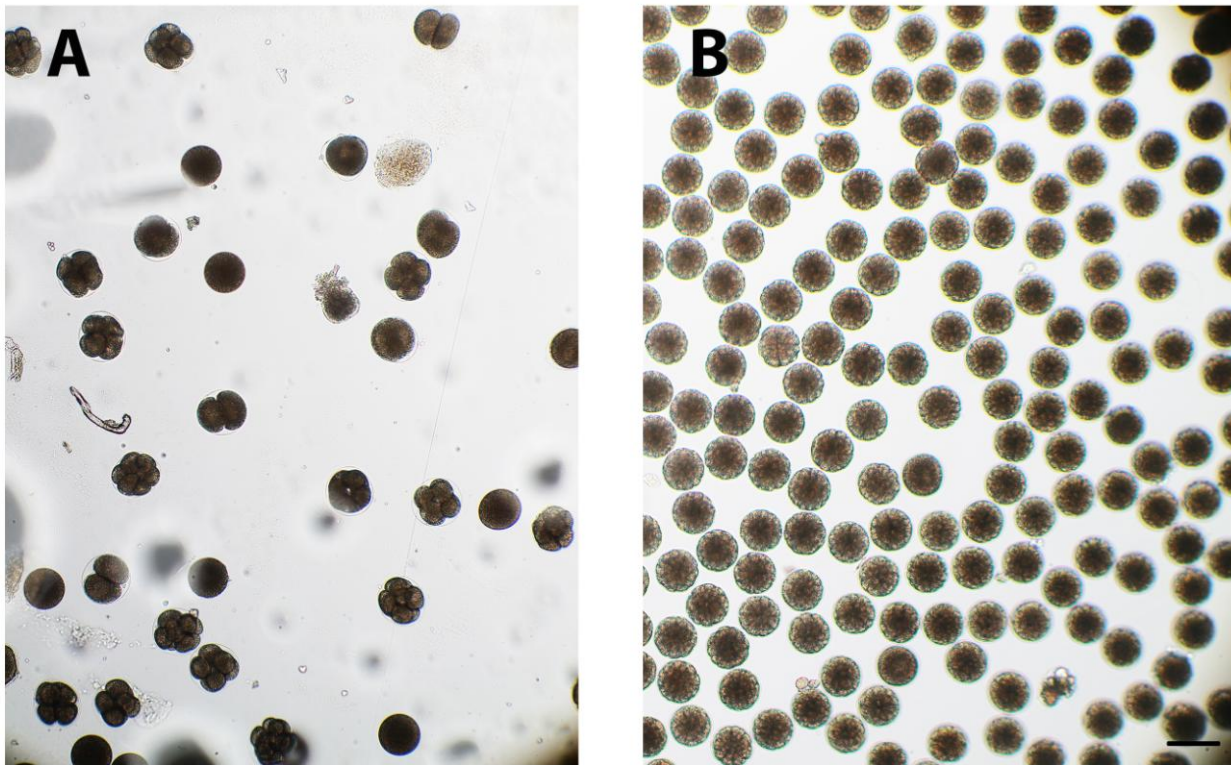


Figura 4: Cultivo de embriones de *Echinometra vanbrunti*. En 3A se muestra un cultivo polispermico ‘no sano’ de *E. vanbrunti*, con una dilución 15:1000, se observa a embriones en diferentes estadios además de algunos desintegrados. En 3B, se observa un cultivo “sano” de la misma especie, con una dilución 5:1000, en donde se evidencia una sincronización del clivaje de todos los embriones. La línea de referencia para A y B es de 100 μm .

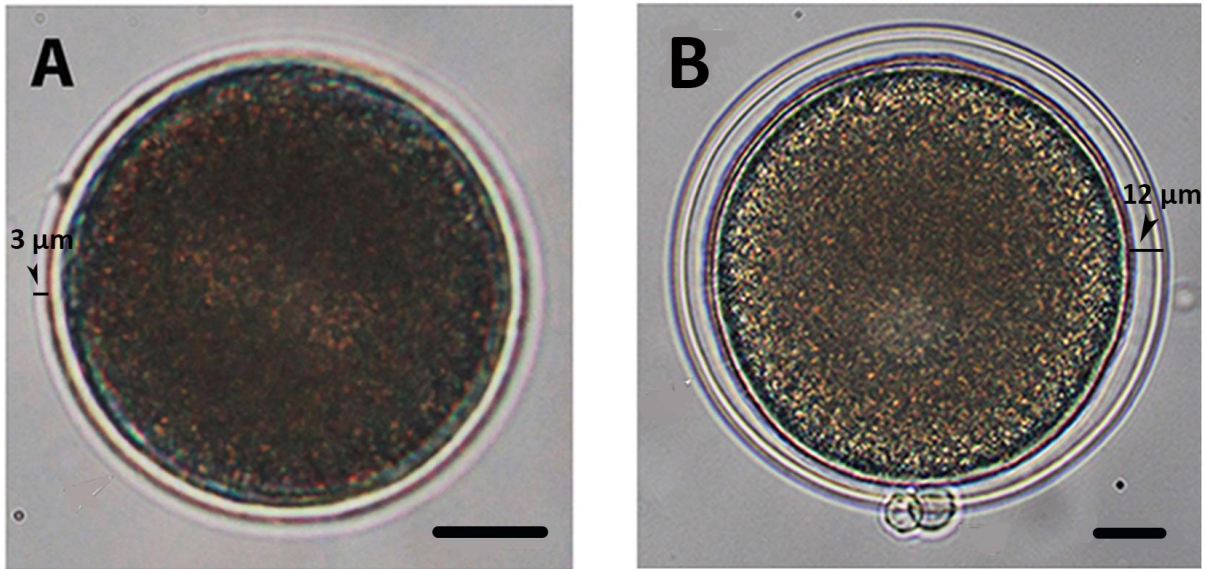
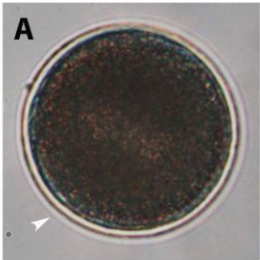


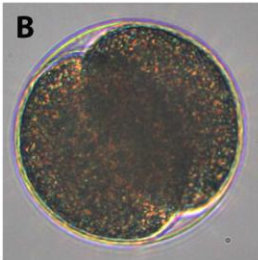
Figura 5: “Membrana de fertilización” en *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*:

La formación de la “membrana de fertilización” es evidente en los huevos fertilizados de las dos especies de erizo de mar. En la figura 5A se muestra un huevo de *E. vanbrunti* fertilizado, la separación entre la membrana hialina del embrión y la “membrana de fertilización” mide 3 µm. En 5B se muestra un huevo fertilizado de *C. gibbosus*, el espacio perivitelínico mide 12 µm aproximadamente. Asimismo, se observa el cono de fertilización sobresaliendo desde un único punto, que es por donde entro el espermatozoide. La línea de referencia para la figura A y B es de 20 µm.

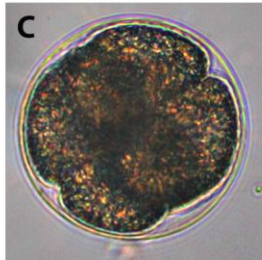
E. vanbrunti



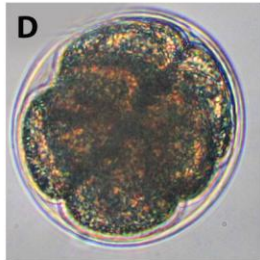
Fecundado



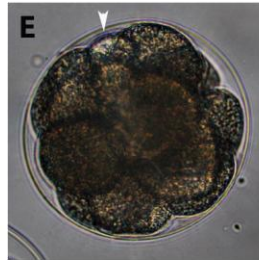
Primer clivaje



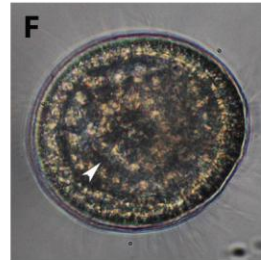
Segundo clivaje



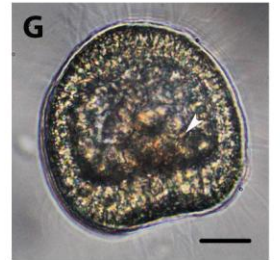
Tercer clivaje



Cuarto clivaje



Blástula



Gástrula

C. gibbosus

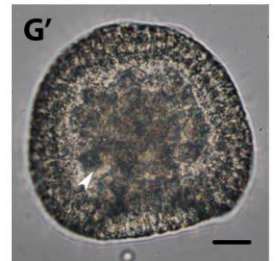
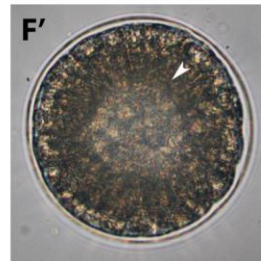
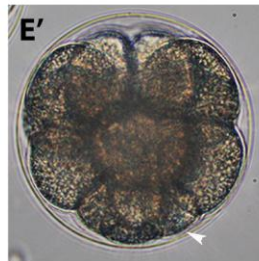
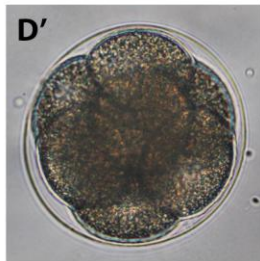
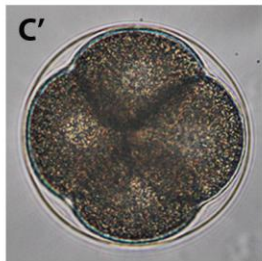
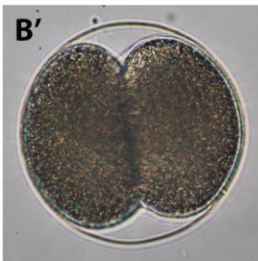
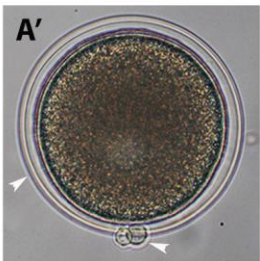
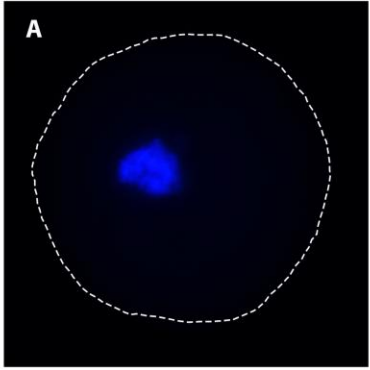
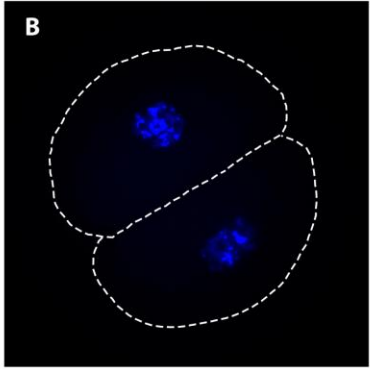


Figura 6: Tabla de desarrollo comparativa entre *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*. Se muestra el desarrollo temprano de ambas especies de erizo de mar *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*. En la figura 6A y 6A' se señala con una flecha blanca la “membrana de fertilización” levantada. Los huevos de *E. vanbrunti* miden $\pm 78\mu\text{m}$ y para *C. gibbosus* $\pm 120\mu\text{m}$. En la figura 6B, 6B', 6C, 6C' se muestra el clivaje holoblástico radial, que genera blastómeros del mismo tamaño en el estadio de 2 y 4 células. En la figura 6D y 6D' se muestran embriones de 8 células, todos los blastómeros son del mismo tamaño. En la figura 6E y 6E' se señala con la flecha blanca los micrómeros, que son el organizador de los embriones de erizo de mar. En la figura 5F y 5F' se señala al blastocele como la cavidad que se forma en el estadio de blástula. En la figura 5G y 5G' se señala a las células del mesénquima que han ingresado en el estadio de la gástrula. La línea de referencia de tamaño para todos los embriones es de $20\mu\text{m}$.

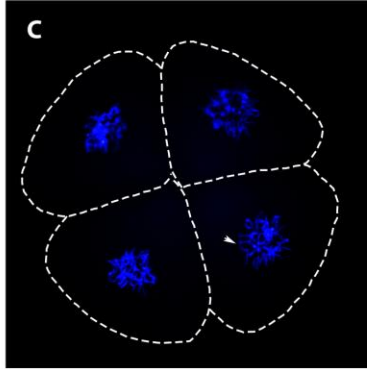
E.vanbrinti



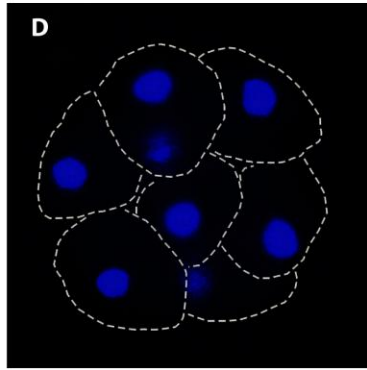
Fertilizado



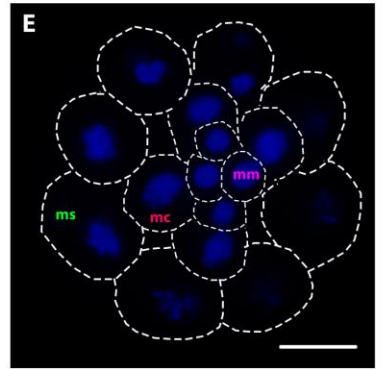
Primer clivaje



Segundo clivaje



Tercer clivaje



Cuarto clivaje

C.gibbosus

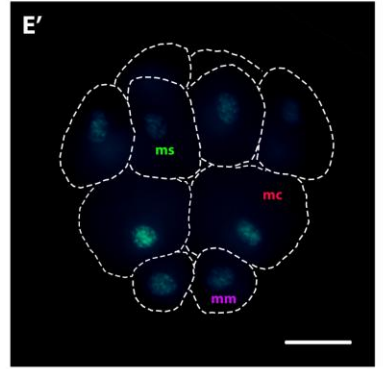
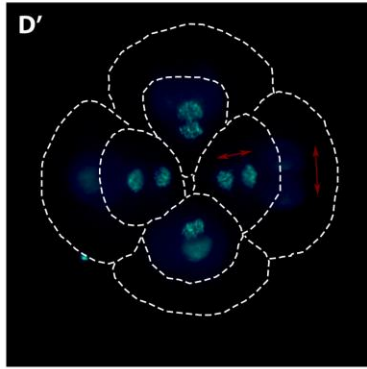
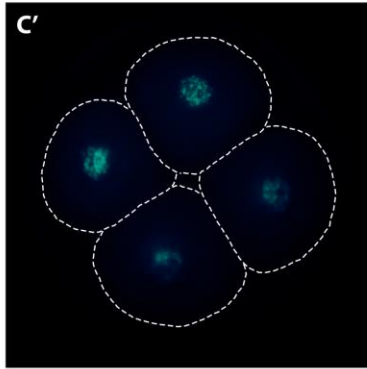
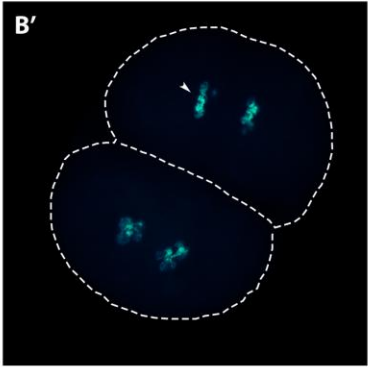
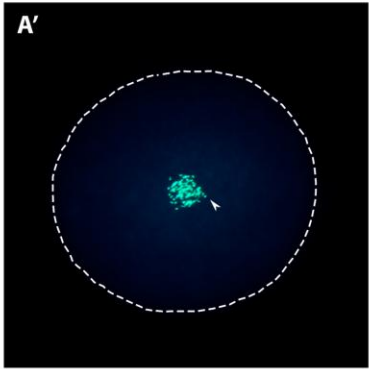


Figura 7: Desarrollo temprano *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus* revelado con DAPI. Se muestran embriones hasta el cuarto clivaje en ambas especies, *E.vanbrunti* y *C. gibbosus*. En la figura 7A', 7B' y 7C, se señala con una flecha los cromosomas condensados. En la figura 7D', se muestra con flechas rojas el clivaje desigual del polo animal y vegetal. En la figura 7E y 7E' se reconocen tres tipos de células, los mesómeros (ms), los macrómeros (mc) y los micrómeros (mm). La línea de referencia para las dos especies es de 20 µm.

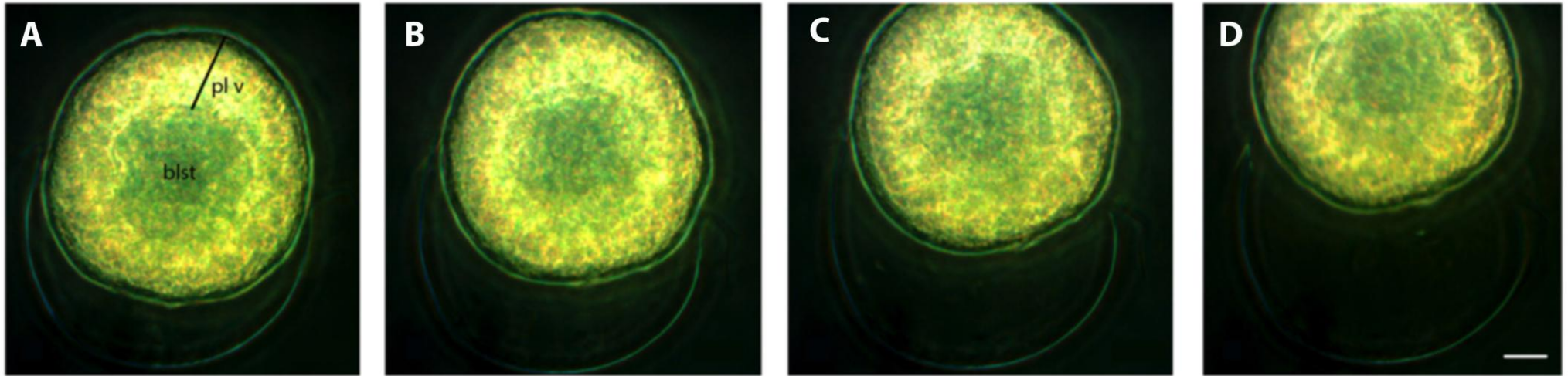


Figura 8: Nacimiento larva de vida libre en *Caenocentrotus gibbosus*: Una blástula de *C. gibbosus* en proceso de nacimiento. Se puede observar cómo va desprendiéndose de la “membrana de fertilización” con ayuda de los cilios. La barra negra en 7A señala la placa vegetal (pl v) y el blastocele (blst), el nacimiento se realiza desde la parte vegetal del embrión. La barra de referencia para todas las figuras es de 20 μm .

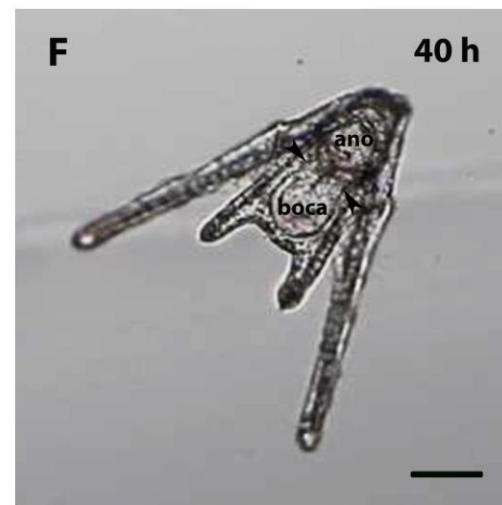
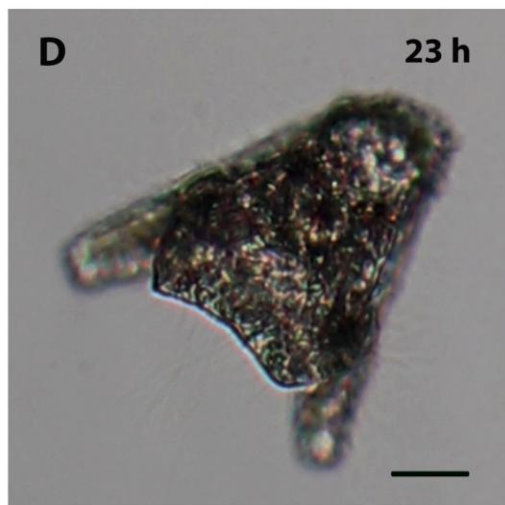
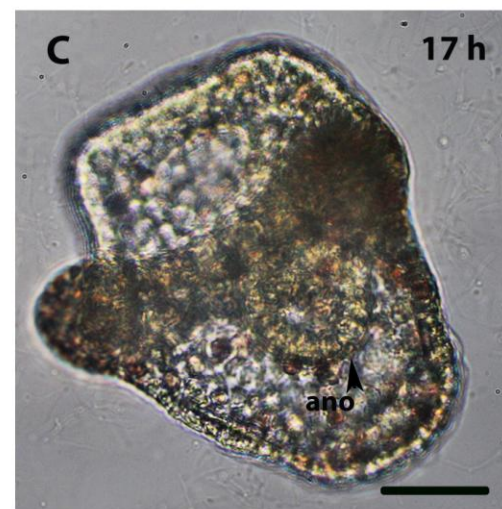
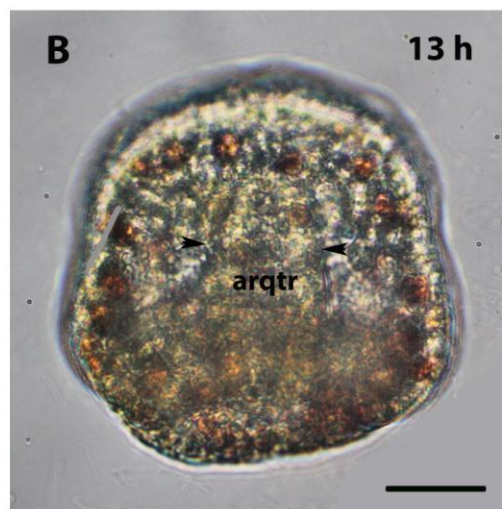
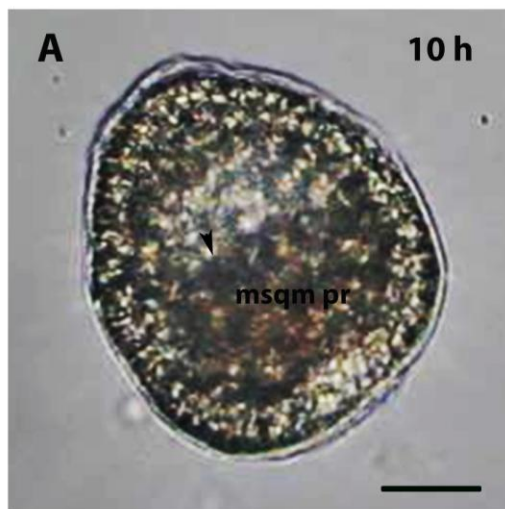


Figura 9: Desarrollo de la larva de *Echinometra vanbrunti* hasta el estadio de larva pluteus que se alimenta: En la figura 9A se muestra una gástrula, señalándose al mesénquima primario (msqm. pr). Para las 15 horas como se muestra en la figura 8B se encuentra el arquenterón (arqtr), en la figura 9C se puede observar que la larva ya posee una forma trapezoide y se señala al ano. Para las 23 horas, la larva ya posee la forma característica de la larva pluteus, en la figura 9D se muestra una larva pluteus que no se alimenta. En la figura 9E y 9F se observa a la larva pluteus que se alimenta, se señalan las tres cavidades diferenciadas del intestino de la larva, la misma que muestra contracciones. La línea de referencia de tamaño es de 30 μm en 9A, 9B y 9C; y de 40 μm para 9D, 9E y 9F.

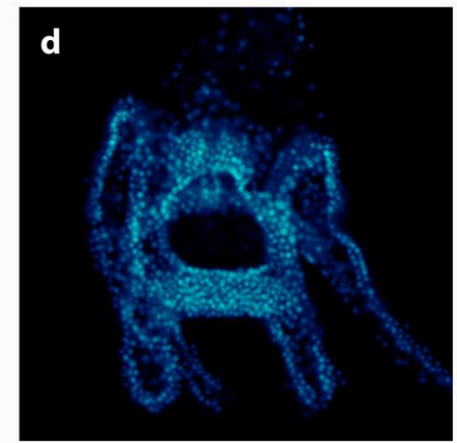
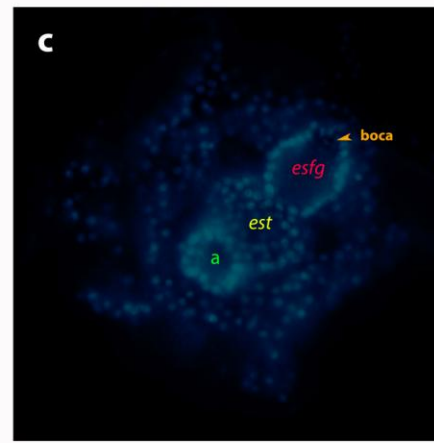
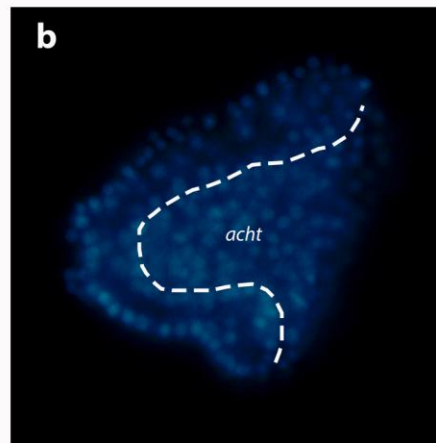
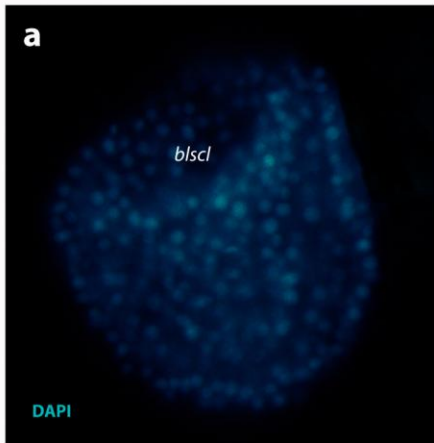
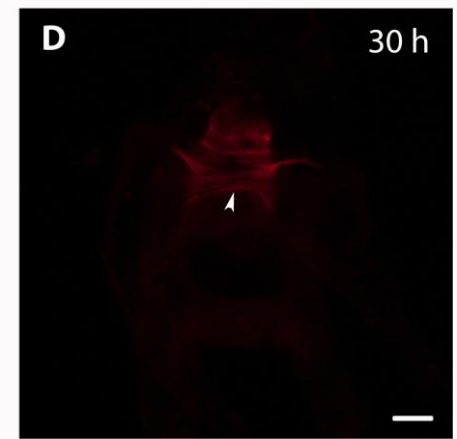
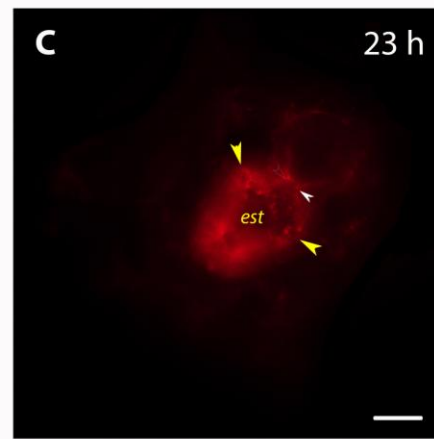
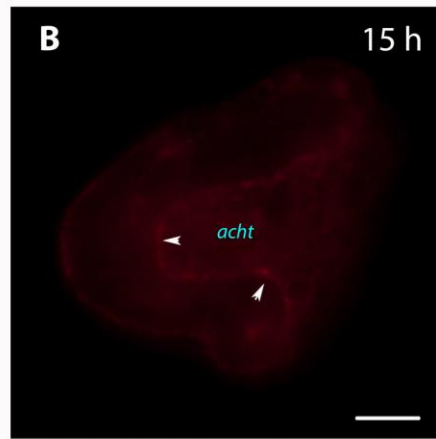
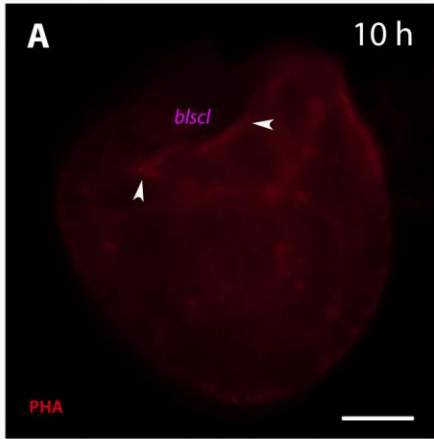


Figura 10: Desarrollo larval de *Echinometra vanbrunti* con el uso de sondas no inmunológicas Phalloidin y DAPI: Mediante el uso de sondas no inmunológicas se ve detalladamente la expresión de f-actina (pha) y núcleos (DAPI) en la larva de *E. vanbrunti*. La figura 10A y 10a muestran una gástrula a las 7 horas, donde no hay expresión de fibras musculares visibles, se señala al blastocele (blscl). En la figura 10B se muestra (flechas blancas) el arquenterón, sus paredes presentan reactividad leve para fibras musculares a las 15 horas, en 10b se muestra otro punto de enfoque de la larva. En la figura 10C se observa la larva de 23 horas, donde ya se pueden ver marcado (flechas blancas) el esfínter que separa al esófago del estómago. En la figura 10c se puede ver con más detalle la división de las estructuras del sistema digestivo, marcada la boca, el esófago (esfg), el estómago (est) y el ano (a). La línea de referencia es de 20 μm para todas las figuras.

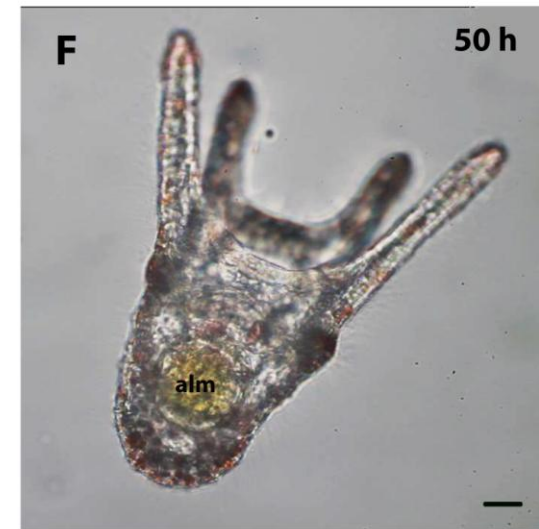
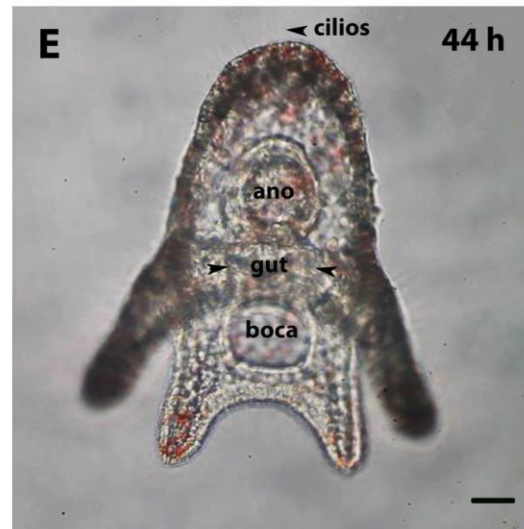
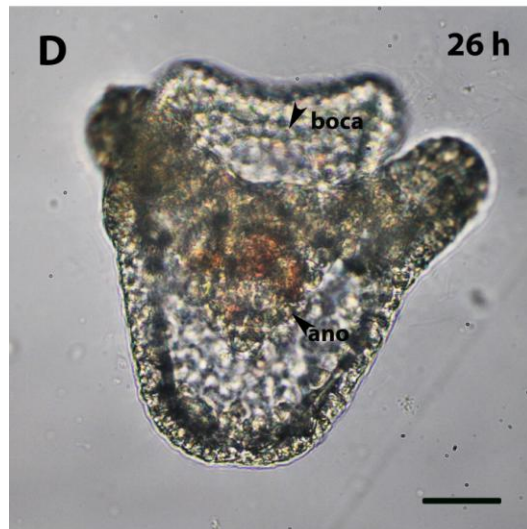
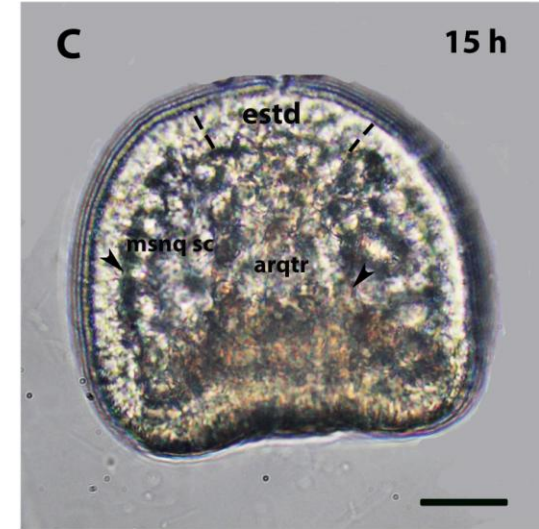
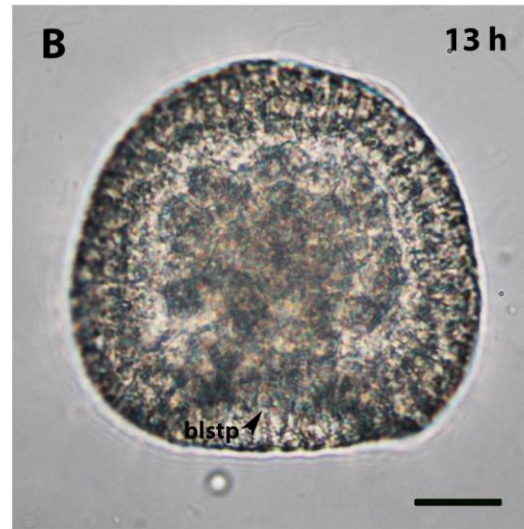
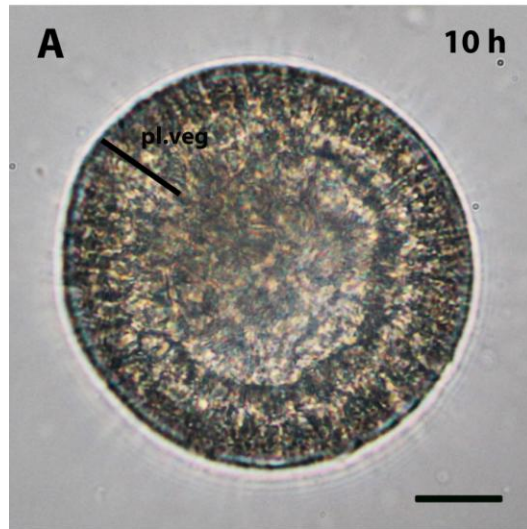


Figura 11: Desarrollo de la larva de *Caenocentrotus gibbosus* hasta el estadio de larva pluteus que se alimenta: En la figura 11A se señala con las flechas negras las células del mesénquima primario (msnq pr) su presencia es característica de la larva de vida libre, en el estadio de gástrula. Para las 15 horas (11B) se muestra un estadio similar que para las 10 horas, se señala en este estadio al blastoporo (blstp). La figura 11C, muestra el estadio de prisma en la hora 21, se muestra la zona sugerida donde se formará el estomodeum (estd) y se señala al arquenterón (arqtr) y al mesénquima secundario (msnq sc). La figura 11D, muestra una larva con boca y ano. La figura 11E y 11F muestran una larva desarrollada con las tres cavidades del sistema digestivo desarrollada; 11E muestra una larva desarrollada sin alimento en el estómago, mientras que 8F ya es una larva que presenta alimento (alm) en su estómago. La línea de referencia es de 20 μm en 11A, 11B y 11C; y de 30 μm para 11D, 11E y 11F. Las líneas de referencia para todas las figuras es de 20 μm .

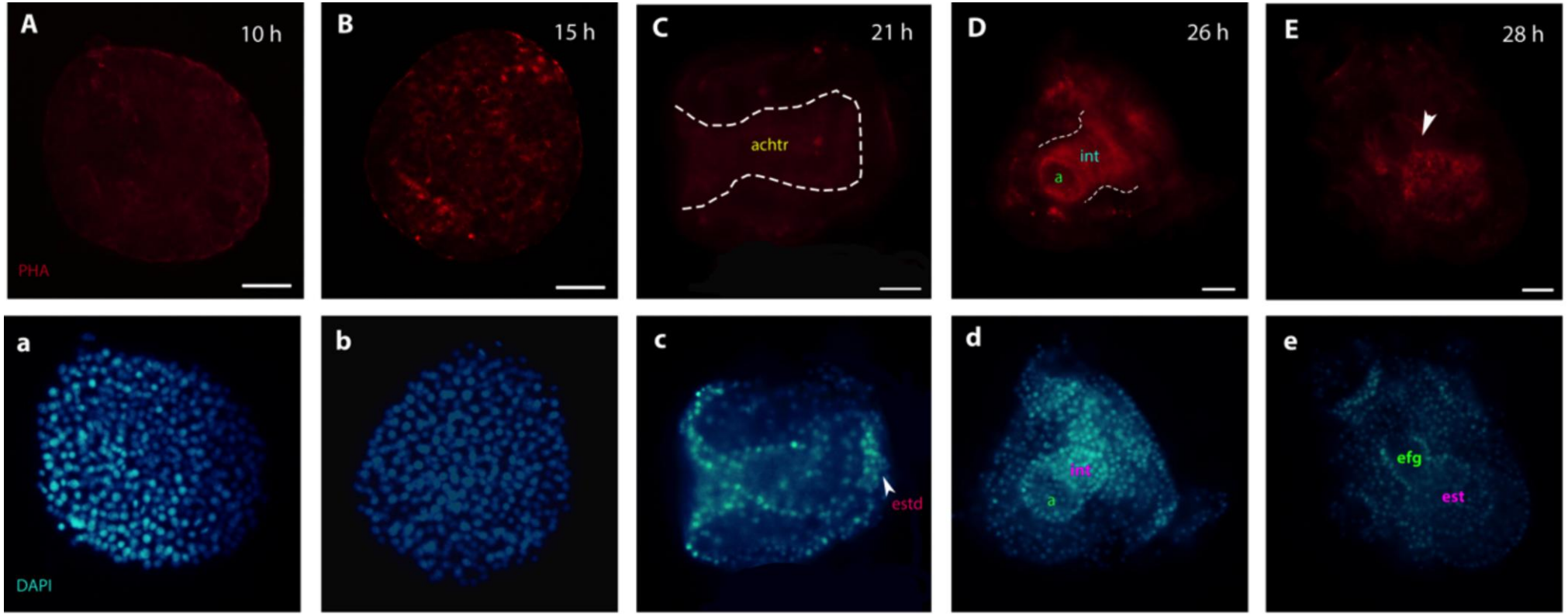


Figura 12: Desarrollo larval de *Caenocentrotus gibbosus* con el uso de sondas no inmunológicas Phalloidin y DAPI: La figura 12A y 12a muestran una gástrula a las 7 horas, donde no hay expresión para f-actina. En la figura 12B se muestra que para las 15 horas, no hay expresión de f-actina, siendo similar a la larva de 7 horas. En la figura 12C se observa la larva de 21 horas, se encuentra marcado con una línea punteada al arquenterón (achtr) en 9c se señala con la flecha blanca al estomodeum (estd). En 12D se observa, en el estadio de prisma, señal para phalloidin en las paredes de lo que será el sistema digestivo (marcado como int) y el ano (a). En 12E y 12e, se señala al esófago y al estómago, ambas cavidades presentan señal para phalloidin. Además en 12e se señala con las flechas blancas el esfínter que separa al esófago (efg) del estómago (est). La línea de referencia es de 20 μm para todas las figuras.

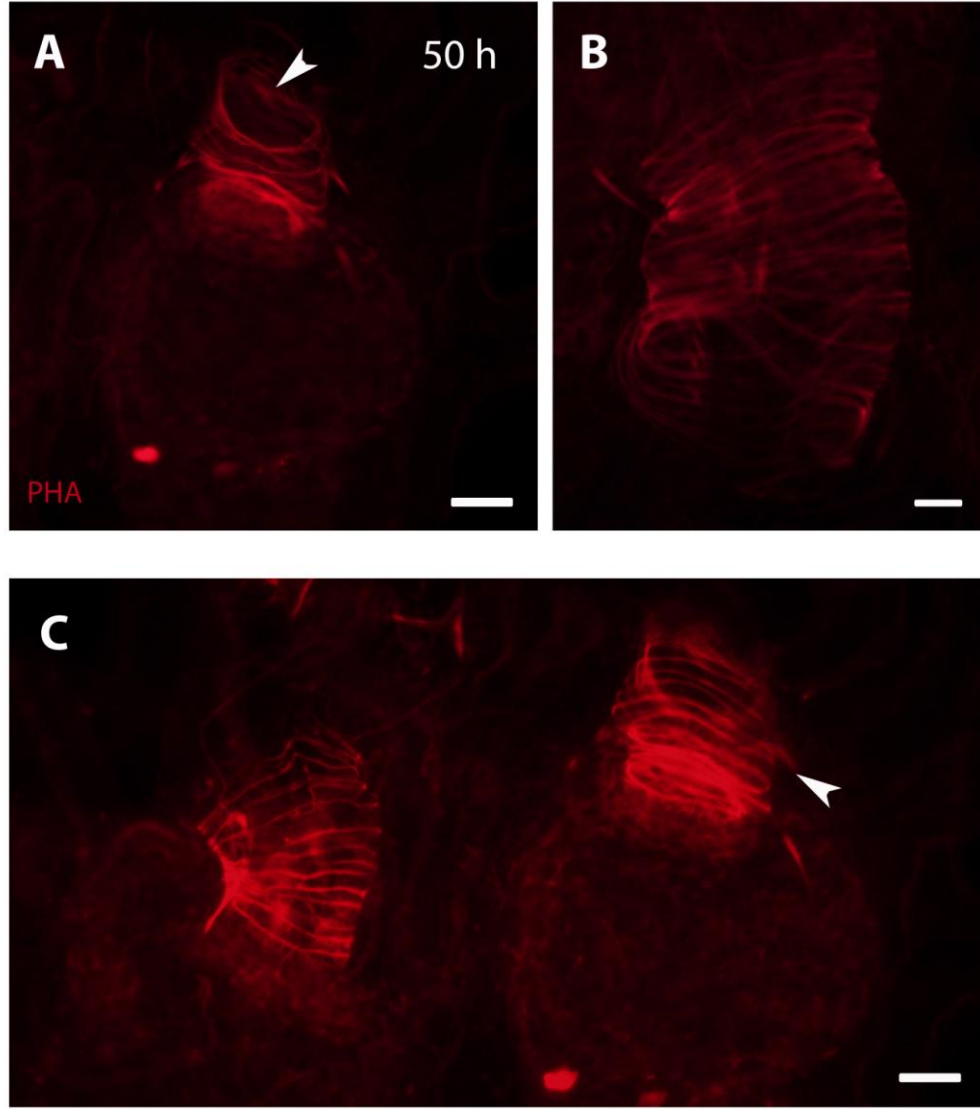


Figura 13: Larva de 50 horas de *Caenocentrotus gibbosus* revelado con la sonda no inmunológica phalloidin. Se muestra la larva teñida con phalloidin. En 12A se muestra la larva con estructuras desarrolladas con una señal clara para phalloidin, mostrándose las células de actina en forma de anillo alrededor del esófago. En 12B, se muestra un acercamiento de las estructuras musculares en el esófago. Y 10C muestra otras larvas pluteus con una señal fuerte de phalloidin en el esófago (flecha blanca). La línea de referencia para 13AA y13C es de 20 μm , para 13B es de 5 μm .

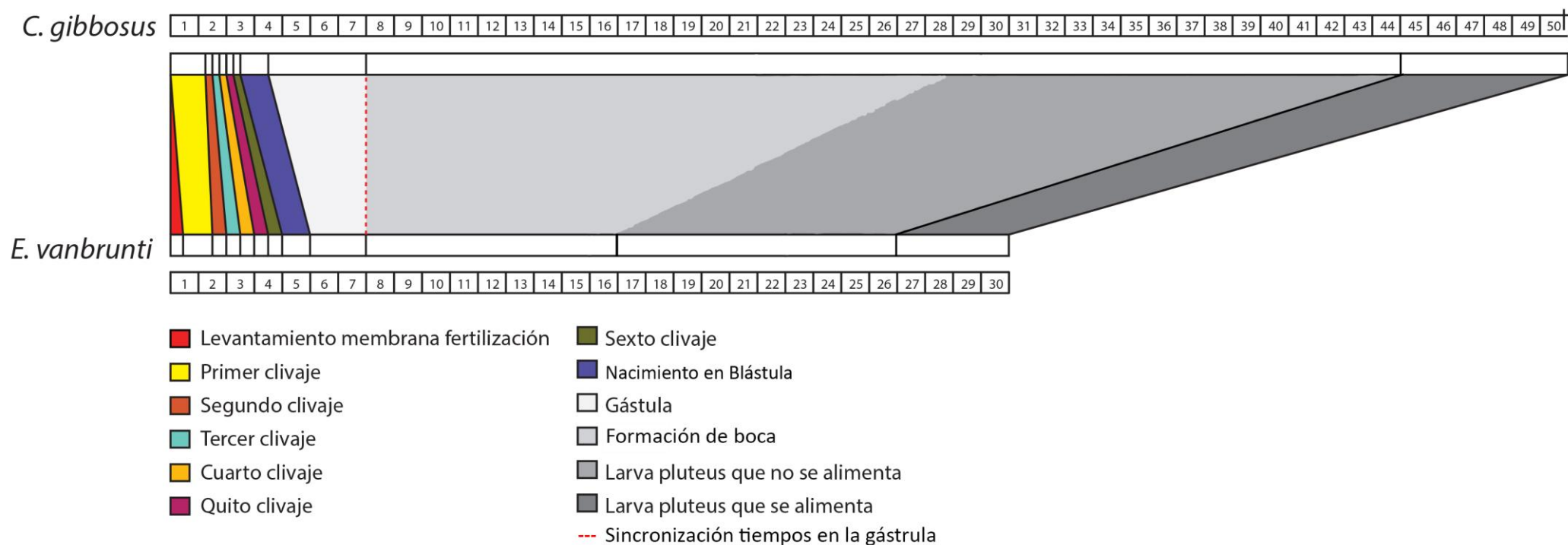


Figura 14: El diagrama muestra las diferencias temporales del desarrollo temprano hasta larva que se alimenta y del tamaño de huevo entre las dos especies estudiadas: *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*. Con colores se separa cada evento del desarrollo. Las diferencias temporales dividen en dos módulos el desarrollo embrionario y larval estudiado. El primero que va desde la fecundación hasta la gástrula y el segundo de la gástrula hasta la conformación de la larva que se alimenta. La división de estos dos módulos se marca con la línea punteada roja.

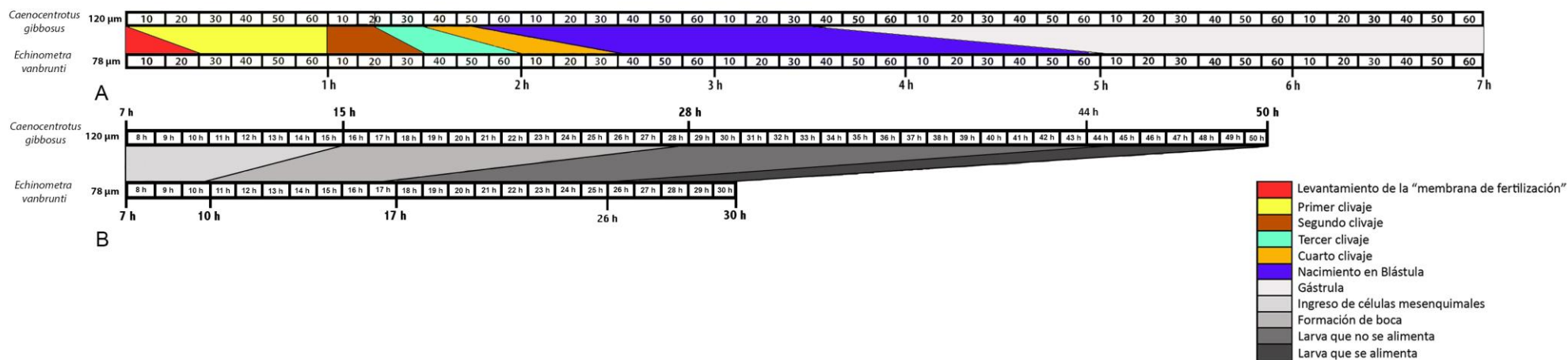


Figura 15: Diagrama temporal detallado de los módulos del desarrollo embrionario y larval entre *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*. Se detalla los tiempos de desarrollo temprano de las dos especies de erizo de mar estudiados comparando también el tamaño de su huevo. En A, se marca en escala de minutos, el primer módulo: desde el levantamiento de la “membrana de fertilización” hasta el estadio de gástrula, en donde se sincronizan los tiempos de desarrollo. En B, se muestra en escala de horas, el segundo módulo: desde el estadio de gástrula hasta la formación de una larva pluteus que se alimenta.

9. TABLAS

Tabla 1: ANOVA de las diluciones de esperma. Se presenta el ANOVA de un factor o DCA de los tres tratamientos de esperma (1:1000, 5:1000 y 15:1000). La tabla muestra un valor de p o significancia menor a 0.05 lo que indica que existe una diferencia significativa entre tratamientos.

ANOVA					
Huevos Fertilizados					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	36669,800	3	12223,267	41,814	,000
Intra-grupos	4677,200	16	292,325		
Total	41347,000	19			

Tabla 2: Prueba de homogeneidad de varianzas. Se muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos de esperma usados, tomando como positiva a la hipótesis H_0 , ya que el valor de significancia es > 0.05 .

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Huevos Fertilizados			
Estadístico de			
Levene	gl1	gl2	Sig.
2,802	3	16	,073

Tabla 3: Prueba de significancia de Tuckey. Prueba de significancia HSD de Tuckey acerca de las diferentes diluciones de esperma usadas. La tabla agrupa a los subconjuntos que son homogéneos entre sí. Se observan tres bloques en donde el tratamiento 3 (dilución 15:1000) y 4 (dilución control, 1:1 esperma-oocitos) forman un grupo homogéneo, de igual forma el tratamiento 1 (dilución 1:1000) y 3 (dilución 5:1000). Se observa que el tratamiento 2 (dilución 5:1000) se encuentra en un grupo aislado, mostrando que no es homogénea (valor de 1) cuando es comparada con los demás tratamientos.

Huevos Fertilizados					
HSD de Tuckey					
Diluciones Esperma		Subconjunto para alfa = 0.05			
		N	1	2	3
	4	5	37,40		
	3	5	53,00	53,00	
	1	5		78,40	
	2	5			149,20
	Sig.		,493	,128	1,000

Variable dependiente: Dilución de esperma

Tabla 4: Comparación del desarrollo entre *Echinometra vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*. Se indican las diferencias en los tiempos de desarrollo entre *E. vanbrunti* y *C. gibbosus*, en cada estadio.

Tabla comparativa del desarrollo		
Etapa de Desarrollo	<i>E. vanbrunti</i>	<i>C. gibbosus</i>
1 célula/membrana		
levantada	20 minutos	0.1 minutos
1st clivaje	1 h	1 h
2nd clivaje	1 h 30min	1 h 15 min
3rd clivaje	2 h	1 h 30 min
4th clivaje	2h 20 min	1 h 45 min
Blástula	5h	3 h 30 min
Gastrulación	7 h	7h
Prisma temprana	15 h	21h
Larva competente		
que no se alimenta	22 h	29 h
Larva que se		
alimenta	30 h	50 h

Tabla 5: Fechas de inducción, número de individuos fecundados y sexo determinados. Meses en los que se realizaron las inducciones para *E. vanbrunti* y *C. gibbosus* de mayo 2012-junio 2013 y marzo y abril de 2014. Se muestra los valores con números de individuos de ambos sexos que liberaron gametos en los meses indicadas, también se marca no ID como los individuos que no liberaron gametos, su sexo no fue identificado. Con negritas se marca los meses en los que la fecundación in vitro tuvo éxito. Para *E. vanbrunti* en el mes de mayo de 2012 se realizaron dos ensayos en fechas diferentes y con individuos diferentes (marcado con números 1 y 2).

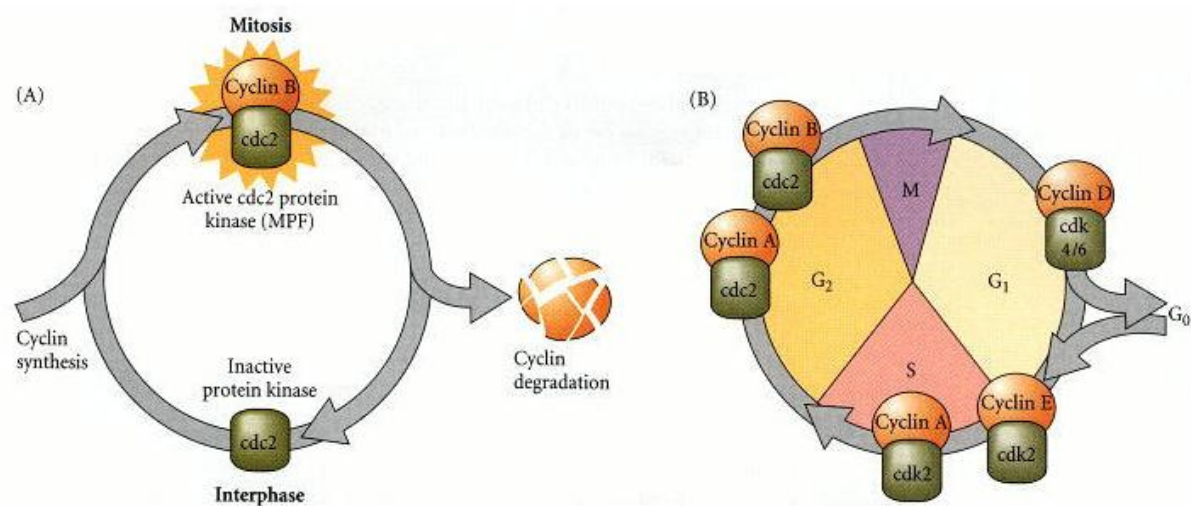
<i>Echinometra vanbrunti</i>				
	M	F	no ID	Total ind
mayo 2012 (1)	4	5	0	9
mayo 2012 (2)	5	4	3	12
junio 2012	6	6	0	12
julio 2012	0	3	5	8
agosto 2012	3	5	0	8
septiembre 2012	1	0	7	8
noviembre 2012	0	1	6	8
febrero 2013	0	3	5	7
mayo 2013	0	3	5	8
junio 2013	2	0	7	9
marzo 2014	6	6		12
abril 2014	1	1	0	2
<i>Caenocentrotus gibbosus</i>				
	M	F	no ID	Total ind
agosto 2012	2	1	0	3
septiembre 2012	1	0	1	2
junio 2013	0	0	3	3
marzo 2014	1	1	0	2
abril 2014	1	1	0	2
Sumatoria Total				115

Tabla 6: Tabla descriptiva de características del desarrollo embrionario y larval en equinodermos separados por estadio.

Estadio	Característica
Oocito maduro	No es evidente la membrana vitelina. El huevo está cubierto por una capa de gelatina que atrae al espermatozoide (quimiotaxis).
Embrión fecundado	Presencia “cono de fertilización”, indica el punto de ingreso del espermatozoide (Flecha negra en figura 5B), ocurre la reacción cortical en la membrana celular del huevo, como medida preventiva de polispermia (Gilbert, 2010; Lepage, 2000). “Membrana de fertilización” evidente alrededor de todo el embrión. Núcleo diploide condensado.
Primer clivaje	Clivaje meridional. Divide por completo al embrión partiendo por la mitad al polo animal y vegetal.
Segundo clivaje	Clivaje meridional y opuesto al primero. Forma cuatro blastómeros poseen ambos polos, animal y vegetal.
Tercer clivaje	Clivaje ecuatorial y perpendicular. Se separan los hemisferios animal y vegetal de cada uno de los blastómeros.
Cuarto clivaje	Polo animal y vegetal se separan y diferencian. Blastómeros del polo animal se dividen meridionalmente y los del polo vegetal ecuatorialmente. Se forman 3 tipos de células diferenciadas. Los macrómeros (mc), mesómeros (ms) y micrómeros (mm), en figura 7E y 7E’.
Blástula	Nacimiento larva de vida libre. El polo animal posee cilios (larva trocófora), con ellos la blástula se impulsa para desprenderse de la “membrana de fertilización”. El nacimiento ocurre desde el lado vegetal del embrión (figura 8), en 8A se señala la placa vegetal (pl v) y el blastocele (blste).
Gástrula	Ingresión, invaginación y extensión celular para la formación del arquenterón. Células mesénquimales evidentes (figura 6G, 6G’, 9A y 11A). Formación blastoporo. Larva cubierta por cilios, posee mucho movimiento Se comienza a pigmentar la larva (figura 6G, 6G’. 9A, 11A, 11B, 11C)..
Prisma	El arquenterón está extendido en dirección al estomodeum (figura 11C y 12c), donde estará la boca de la larva. Forma trapecioideal, larva cubierta de cilios. Todavía no se alimenta.
Larva pluteus de 2 brazos	La boca, el esófago, estómago y el ano ya están formados (figura 9E, 9F, 10D, 10d, 11E, 11F, 13C). Larva con forma de cohete, presenta contracciones musculares en el tracto digestivo, ya es capaz de alimentarse (figura 9F, 10D, 11F, 13C). Posee cilios que le sirven para el nado y además direccionan simultáneamente la comida hacia la boca.

10. ANEXOS

Anexo 1: Ciclo de la mitosis celular. Ciclo bifásico de la mitosis en células somáticas en los blastómeros en embriones de anfibios. A) El ciclo mitótico con solo dos estados, el mitótico (M) y de síntesis de ADN (S). B) El ciclo completo de la mitosis, aquí se incluye G1 y G2 en la interfase del ciclo mitótico. Se muestran a las ciclinas encargadas de regular el ciclo mitótico de división en los blastómeros (Gilbert, 2010).



Anexo 2: Descripción soluciones utilizadas.**PBS**

5x Buffer fosfatado

Para un volumen de la solución stock (5x) de 500 ml, a un **pH 7.2-7.4**, guardado a una temperatura de 4°C.

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	33.48 g
<hr/>	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	7.93 g
<hr/>	

PBT

Para un volumen de 50 ml. Guardado a una temperatura de 4°C.

PBS 0.1 M	49.85 ml
<hr/>	
0.3 % Triton X-100	0.15 ml
<hr/>	

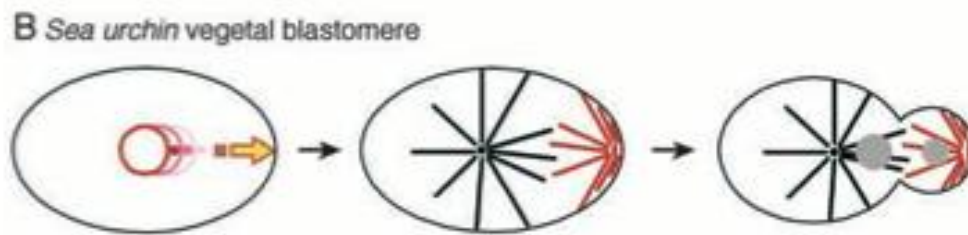
PFA

Fijativo de formaldehído en PBS al 4%

Para un volumen de 50 ml.

Formaldehído 37%	5.4 ml
<hr/>	
PBS 0.1 M	44,59 ml
<hr/>	

Anexo 3: Asimetrías en el clivaje de células vegetales en erizos de mar. Organismos modelo. Células vegetales de un embrión de erizo de mar. Se observa la migración lateral del núcleo (círculo vacío que cambia de rojo a rosado) liderada por el centrosoma (círculo pequeño que cambia de rojo a rosado), antes de la formación del surco mitótico, la división lateral da lugar a una ubicación asimétrica del surco. En telofase (óvalos grises representan al ADN en telofase), se ve como el macrómero es esférico mientras el micrómero es aplanado, esto por acción de los áster en la mitosis (Kaltschmidt y Brand, 2002).



Anexo 4: Distribución geográfica de ambas especies de erizo de mar en el Pacífico, información obtenida del WoRMS (según (a,b)Kroh, 2013 –WoRMS-).

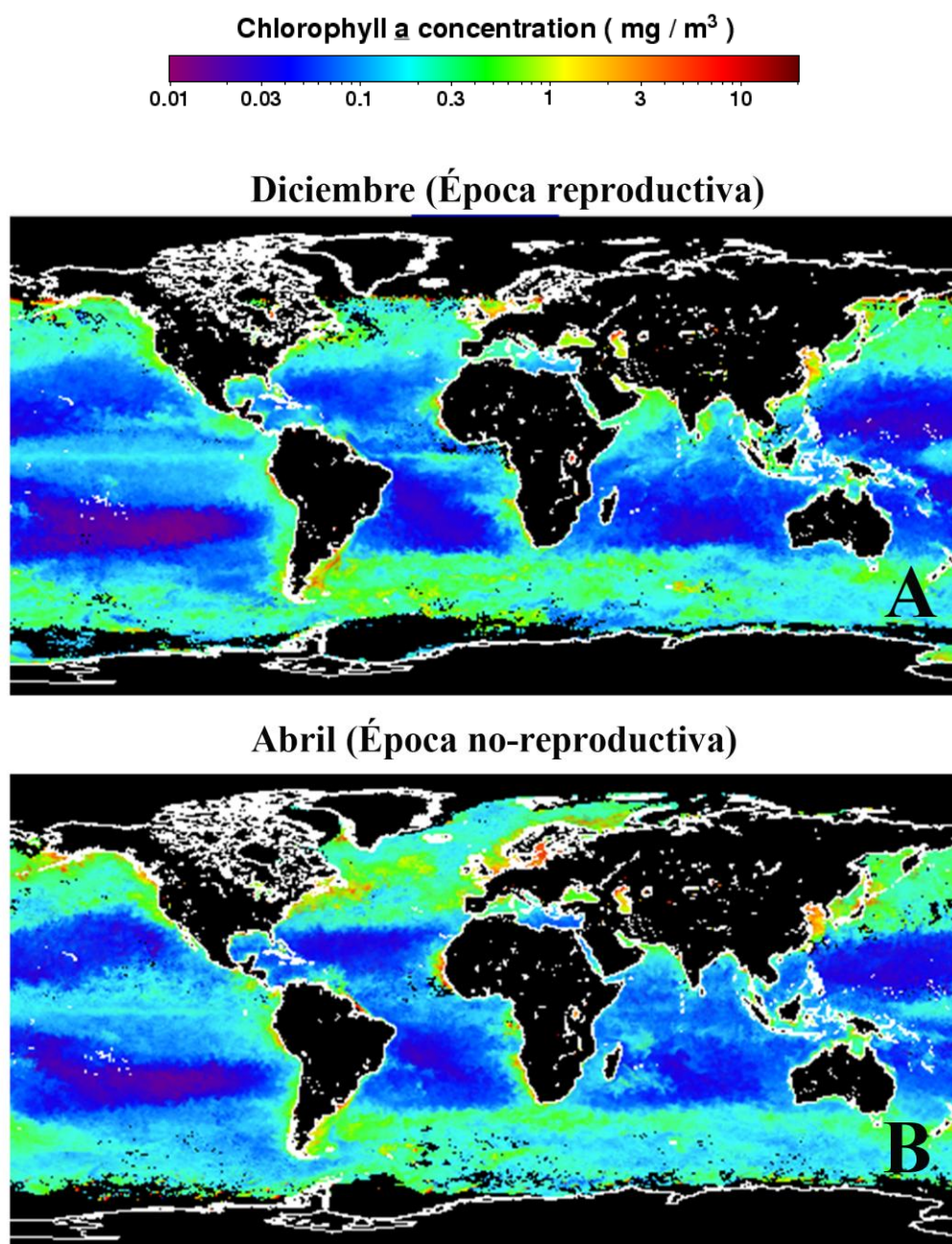
Echinometra vanbrunti



Caenocentotus gibbosus



Anexo 5: Distribución de clorofila II en los océanos del mundo. Información tomada de Oceancolor, grupo de estudios oceanográficos MODIS (por sus siglas en inglés: Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer) de la NASA.



Anexo 6: Tabla de desarrollo comparativo entre *Strongylocentrotus purpuratus* (Ettensolhn et al. 2004), *Echinometria vanbrunti* y *Caenocentrotus gibbosus*.

Etapas de Desarrollo	<i>S. purpuratus</i>	<i>E. vanbrunti</i>	<i>C. gibossus</i>
1 ^{er} clivaje	2-2.25 h	1 h	1 h
2 ^{do} clivaje	4 h	1 h 30min	1 h 15 min
3 ^{er} clivaje	5.5 h	2 h	1 h 30 min
4 ^{to} clivaje	6.5 h	2h 20 min	1 h 45 min
Eclosión de blastula	27 h	5h 30 min	3 h 15 min
Gastrulación	30 h	7 h	7h
Prisma temprana	3 días	15 h	21h 45 min
Larva pluteus temprana	4 días	24 h	63 h

Anexo 7: Corrientes marinas del Pacífico ecuatorial. Se muestra la convergencia de corrientes en las costas ecuatorianas. Mostrando la corriente cálida que viene desde Panamá, la corriente fría del Perú o Humbolt y la convergencia de estas dos corrientes que forman la corriente de la costa ecuatoriana (Sonnenholzner *et al.*, 2012).

